

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАКТОБАЦИЛЛ ПРИ СФОРМИРОВАВШЕЙСЯ МИКРОФЛОРЕ КИШЕЧНИКА У ТЕЛЯТ

А.Н. ОВЧАРОВА¹, Я.В. ЛИФАНОВА², Е.В. КРАПИВИНА², Е.С. ПЕТРАКОВ¹

¹ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных,

г. Боровск, Россия

²Брянская государственная сельскохозяйственная академия

г. Брянск, Россия

Введение. Гомеостаз является результатом сложных координационных и регуляторных взаимоотношений, осуществляемых как в целостном организме, так и на органном, клеточном и молекулярном уровнях. В формировании гомеостаза значительная роль принадлежит микрофлоре, населяющей кишечник. Основная часть нормальной микрофлоры теплокровных животных представлена такими анаэробами как бифидобактерии, лактобациллы и энтерококки, бактероиды и микроорганизмами с факультативным дыханием – эшерихиями, при этом у молодняка больше всего представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* (Антипов, 1981). Лактобактерии выполняют многообразные функции, участвуя в жизнедеятельности макроорганизма. Они обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условнопатогенных микроорганизмов, а также в отношении других видов и даже родственных штаммов лактобацилл (Глушанова, 2003), ингибируют адгезию, пенетрацию и размножение патогенных и условнопатогенных микроорганизмов, обладают широким спектром антимикробных механизмов, продуцируют активные вещества белковой и небелковой природы, оказывают выраженное иммуностимулирующее и противоопухолевое воздействие (Бондаренко, 2003).

Немаловажное значение придается специфической способности лактобактерий продуцировать в процессе жизнедеятельности питательные субстраты, такие как жирные кислоты, прежде всего летучие жирные кислоты, а также витамины, антиоксиданты, амины и другие микронутриенты, имеющие большое значение не только для пищеварительного тракта, но и для всего организма (Шендеров, 2001).

Уменьшение количества молочнокислой микрофлоры и изменения в соотношении различных групп микроорганизмов в пищеварительном тракте, еще не диагностируемые как заболевание, приводит к нарушению усвоения питательных веществ и, как следствие, наносит значительный экономический ущерб животноводческим предприятиям.

Помимо других факторов, дисбаланс кишечной микрофлоры может вызывать стресс. При этом основной тенденцией для лактобацилл является уменьшение их численности, а для колиформ – увеличение (Fuller, 1986). Стресс может быть вызван любым сильным изменением в физическом

окружении или в эмоциональном состоянии. Перевозка, смена пищи, ветеринарные обработки – это события, вызывающие стресс, который, в свою очередь, может вызвать изменение кишечной микрофлоры. Манифестация проявлений стресса имеет гормональную основу и сопровождается секрецией адренкортикотропных гормонов, которые стимулируют синтез кортикоидов, влияющих на многие физиологические процессы, включая усиленную выработку муцина в пищеварительном тракте (Таннок, 1983). Изменения в составе микрофлоры (дисбактериозы), особенно индуцированные антибиотиками, приводят к значительным морфологическим изменениям стенки кишечника, требующим коррекции (Кактурский, 2011). Для нормализации микрофлоры пищеварительного тракта наиболее оправдано, с физиологической точки зрения, применение метода бактериотерапии – использование пробиотических препаратов на основе живых микроорганизмов, являющихся представителями нормальной кишечной микрофлоры. Наиболее точным, по-видимому, является следующее определение: пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при назначении в адекватных количествах оказывают благотворное влияние на здоровье макроорганизма за счет изменения состава и свойств нормальной микрофлоры (Reid, 2001; Hoesl, 2005).

В лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП ранее была составлена ассоциация из 4-х штаммов лактобацилл, обладающих высоким пробиотическим потенциалом, получившая рабочее название «Тетралактобактерин» (Николичева, 2010, 2011).

Полученный препарат ранее был испытан на телятах–молочниках и показал высокую эффективность (Крапивина, 2009, 2011). Известно, что к 3-х недельному возрасту кишечная микрофлора телят в количественном и качественном отношении обычно бывает аналогична микрофлоре взрослых животных. В связи с этим возник вопрос, повторится ли пробиотическое действие тетралактобактерина на телятах с установившейся микрофлорой. В 2012 году были получены первые опытные партии сухой (лиофилизированной) формы препарата.

Целью данной работы было оценить эффективность использования как сухой, так и жидкой формы пробиотика на телятах со сформированной микрофлорой кишечника.

Материал и методы. Для получения жидкой формы препарата культуры, входящие в состав препарата, выращивались индивидуально на среде MRS (Fluka) и после установления количества жизнеспособных клеток смешивались в соотношении 1:1 для получения титра конечного препарата 4×10^9 КОЕ (колонии образующих единиц)/мл. Для получения сухой формы препарата культуры, также выращенные на среде MRS, были индивидуально лиофилизированы и после установления количества жизнеспособных клеток смешивались в соотношении 1:1 для получения титра конечного препарата 2×10^{10} КОЕ/г.

Оценка эффективности использования лиофилизированной ассоциации лактобацилл была проведена в СПК «Родина» Красногорского района Брянской области. Для опыта были сформированы по методу пар–аналогов (Овсянников, 1976) две группы телят черно–пестрой породы 5-недельного возраста (± 2 суток) со средней живой массой $49,53 \pm 1,44$ кг. Животные 1-й группы (n=5) были контрольными, телята 2-й группы (n=10 голов) получали с молоком один раз в сутки препарат тетралактобактерин с 5-недельного возраста в течение 21 суток в количестве 1 г/гол.

Опыт по оценке эффективности использования жидкой формы препарата был проведен в учебно–опытном хозяйстве Брянской ГСХА «Кокино». Для опыта было подобрано 20 голов телят черно–пестрой породы 1,5–2-месячного возраста, которым выпаивали препарат по 20 мл/гол в сутки (4×10^9 КОЕ на голову) в течение 20 суток. Наблюдение за животными продолжали вести в течение месяца после прекращения выпойки препарата.

Контроль живой массы подопытных телят проводили с помощью ленты для измерения живого веса молочных коров и телят. Животные содержались в условиях, соответствующих ветеринарно–зоогигиеническим требованиям. Кормление животных осуществлялось согласно рекомендациям (Нормы и рационы..., 2003). Кровь для исследования брали утром до кормления пункцией яремной вены с соблюдением правил асептики и антисептики. Пробы фекалий для анализа микробиоценоза толстого кишечника получали при акте вынужденной дефекации, анализ проводился в аккредитованном испытательном лабораторном центре ФГУ здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии Брянской области». Время доставки проб (при $t \sim 2 - 4$ °C) в лабораторию не превышало 2,5 часов с момента взятия.

Количество лейкоцитов и эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева, гемоглобин определяли гемиглобинцианидным методом, гематокрит – в гематокритной центрифуге. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом (Кондрахин и др., 2004). В качестве физиологической нормы показателей принимали интервалы значений, приведенные в литературе (Кондрахин, 2004; Карпуть, 1986; Бовкун, 2005).

Результаты и обсуждение. При исследовании эффектов применения сухой формы пробиотика у всех подопытных телят перед началом опыта содержание в крови лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, уровень гематокрита и глюкозы соответствовали физиологической норме. Через 21 сутки опытного периода у животных 1–й и 2–й групп значения этих показателей существенно не изменились по отношению к начальному периоду, статистически значимой межгрупповой разницы по этим показателям не отмечено.

Через месяц после выпаивания пробиотика выявлена тенденция к повышению содержания лейкоцитов в крови у телят, получавших пробиотик, по сравнению с предыдущим периодом исследования, и статистически значимое увеличение по отношению к контрольной группе (на 67%, $P < 0.05$), что указывает на активизацию клеточного звена иммунитета под воздействием пробиотика. Существенных изменений в содержании эритроцитов, гемоглобина и гематокрита в этот период не отмечено.

Уровень глюкозы в крови у телят контрольной группы через месяц от начала опытного периода существенно ($P < 0,05$) снизился по сравнению с 5–и 8–недельным возрастом, при отсутствии статистически значимых изменений концентрации этого метаболита у опытных телят, что указывает на более эффективное расщепление углеводов в кишечнике у телят, получавших пробиотик.

По данным (Бовкун и др., 2005), у клинически здоровых телят этого возраста содержание в фекалиях бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий составляет около $10 \lg \text{КОЕ/г}$. В нашем опыте у телят, получавших сухую форму пробиотика, содержание бифидобактерий в фекалиях соответствовало нормативным значениям, типичных эшерихий, энтерококков – их нижним границам, а численность лактобактерий была ниже нормы при отсутствии статистически значимой межгрупповой разницы. В то же время при применении жидкой формы пробиотика у телят было выделено нормативное количество эшерихий, отмечено более низкое содержание бифидобактерий и лактобацилл. Однако выпойка препарата на протяжении 20 суток повысила количество лактобацилл в кишечной микрофлоре, то есть наблюдалась явная оптимизация микрофлоры по этому показателю.

Кроме того, в содержимом кишечника телят всех групп в повышенном количестве присутствовали клостридии, которые обычно высеваются из проб содержимого кишечника от телят с признаками гастроэнтерита или слабрезистентных, у которых регистрируется дисбактериоз. Выпойка жидкого препарата позволила полностью элиминировать эту группу микроорганизмов. От здоровых телят с оптимальным составом микрофлоры пищеварительного тракта выделить клостридии, как правило, не удается (Тимошко, 1990).

При этом выпаивание обеих форм пробиотика оказало оптимизирующее действие на микробиоценоз кишечника телят. Об этом свидетельствует отсутствие в содержимом их кишечника бактерий *Klebsiella* и грибов *Candida*, которые были обнаружены у телят контрольной группы. Клебсиеллы – это условно–патогенные бактерии. В случаях дисбактериоза, ослабления собственных факторов защиты организма они активно размножаются в тканях и вызывают эндотоксемию, воспалительный процесс в органах (пневмонию, конъюнктивиты, менингиты, сепсис, острые кишечные расстройства).

Грибы рода *Candida* представляют собой компонент микрофлоры, симбионты для человека и животных. В микробной популяции кишечника доля этих грибов обычно ничтожно мала. Грибы *Candida* обладают адгезивностью к эпителиальным клеткам, они вырабатывают протеазы и гликозидазы, способные интенсивно расщеплять муцин клеточной стенки эпителиальных клеток. Рост колоний *Candida* в организме регулируется механизмами естественной резистентности (моноциты/макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты) и нормальной микрофлорой, населяющая просвет желудочно–кишечного тракта, которая вырабатывает вещества с антибактериальной активностью (в частности, бактериоцины и короткоцепочечные жирные кислоты), предотвращающие избыточный рост этих грибов. При избыточном росте грибов *Candida* развивается кандидоз – патологический процесс, возникающий первично в желудочно–кишечном тракте и вторично в других тканях (Данилевская, 2010).

Анализ динамики живой массы подопытных телят, получавших лиофильно высушенный препарат, показал, что перед началом опыта и через 21 сутки опытного периода она существенно не различалась у животных 1–й и 2–й групп с тенденцией к более низким значениям у телят опытной группы.

На 21 сутки опыта существенной и статистически значимой разницы в интенсивности роста зафиксировано не было. Через месяц после окончания выпаивания пробиотика установлены более высокие показатели среднесуточного прироста живой массы у животных опытной группы по

сравнению с контрольной группой ($P < 0.05$), что указывает на пролонгированное положительное влияние пробиотика на рост телят. Это, видимо, обусловлено оптимизацией микробиоценоза кишечника и активизацией клеточного звена иммунитета.

Таким образом, ежедневное использование в кормлении 5-недельных телят сухой формы тетраляктобактерина в суточной дозе 2×10^{10} КОЕ на голову в течение трех недель способствовало активизации защитных функций организма, о чем свидетельствует повышение содержания лейкоцитов в крови ($P < 0.05$), и более эффективному усвоению углеводов, судя по более высокому уровню глюкозы в крови ($P < 0.05$). При этом у телят выявлено положительное влияние препарата на микрофлору толстого кишечника, о чем свидетельствует отсутствие в фекалиях бактерий рода *Klebsiella* и грибов рода *Candida*, которые были обнаружены у телят контрольной группы. О пролонгированном положительном влиянии пробиотика свидетельствуют и данные по динамике роста телят, получавших жидкий препарат. Так, при постановке в опыт средняя живая масса телят составляла $61,8 \pm 2,1$ кг, через 20 дней выпойки препарата – $73,1 \pm 2,2$ кг (среднесуточный прирост 575 ± 51 г), при этом в среднем по стаду среднесуточные приросты ровесников составляли 574 ± 101 г. Таким образом, разницы по этому показателю у подопытных и интактных телят зафиксировано не было. Однако при оценке показателей интенсивности роста через месяц после прекращения выпойки препарата оказалось, что среднесуточные приросты у телят получавших препарат оказались значительно выше, чем у сверстников и составляли $736,6$ г ($P < 0.05$) при живой массе $98,7 \pm 1,5$.

Таким образом, по результатам проведенного эксперимента можно заключить, что у телят с устоявшейся микрофлорой кишечника эффект от использования пробиотиков может проявляться в более поздние сроки, в сравнении с телятами-молочниками. Вероятно, это обусловлено более продолжительным периодом, необходимым задаваемым пробиотическим лактобациллам на успешную колонизацию кишечника и занятие своей ниши в индигенной микрофлоре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов В.А. Биологические препараты симбионтных микроорганизмов и их применение в ветеринарии // Сельское хозяйство за рубежом. 1981. 2: 43–47.
2. Бовкун Г.Ф., Ващекин Е.П., Малик Н.И., Малик Е.В. Микробиоценоз кишечника в норме и патологии у молодняка птиц, крупного рогатого скота и целесообразность пробиотической и пребиотической коррекции. Брянск. 2005. 79 с.
3. Бондаренко В. М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. М.: КМК Scientific Press. 2003. 224 с.
4. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. 2003. 4: 50–58.
5. Данилевская Н.В., Субботин В.В. Дисбактериозы у мелких домашних животных. М.: Зоомедлит, КолосС. 2010. 64 с.
6. Кактурский Л.В., Михайлова Л.П., Овчарова А.Н., Козловский Ю.Е., Серебряков С.Н., Тихонова Н.Б. Морфологическая характеристика тонкой и толстой кишки мышей BALB/C при нарушении состава микрофлоры, индуцированном антибиотиками // Морфологические ведомости. 2011. 2: 36–43.
7. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Минск: Ураджай. 1986. 183 с.
8. Крапивина Е.В., Иванов Д.В., Лифанова Я.В., Масленая Е.А., Тараканов Б.В. Влияние нового пробиотика тетраляктобактерина на микробиоценоз кишечника, морфо-биохимические параметры крови и рост телят-молочников // Проблемы биологии продуктивных животных. 2009. 4: 84–90.
9. Крапивина Е.В., Тараканов Б.В., Масленая Е.А., Иванов Д.В., Поляков А.В., Потий О.В. Уровень естественной резистентности и иммунный статус у телят-молочников при применении пробиотического препарата на основе лактобацилл // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. 1: 78–84.
10. Методы ветеринарно-клинической лабораторной диагностики: справочник (ред. И.П. Кондрахин) М.: КолосС. 2004. 520 с.
11. Николичева Т.А., Тараканов Б.В., Петраков Е.С., Полякова Л.Л. Оценка эффективности нового пробиотического препарата на основе лактобацилл при выращивании и откорме кроликов // Проблемы биологии продуктивных животных. 2010. 4: 97–101.
12. Николичева Т.А., Тараканов Б.В., Петраков Е.С., Полякова Л.Л. Изучение острой и хронической токсичности пробиотических штаммов молочнокислых бактерий на лабораторных животных // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. 3: 97–105.
13. Нормы и рационы кормления с.-х. животных. Справочное пособие (ред. А.П.Калашников, В.И.Фисинин, В.В.Щеглов, Н.И.Клейменов). М., 2003. 456 с.
14. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве. М.: Колос. 1976. 304 с.
15. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. Кишинев: Штиинца, 1990: 6–26, 124–150.
16. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том III. Пробиотики и функциональное питание. М.: Грантъ. 2001. 288 с.

17. Fuller R., Newman H.N., Snoeyenbos G.H., Gould G.W., Rhodes–Roberts M.E., Charnley A.K. Microbial competition in the mouth and gastrointestinal tract. In: *Natural Antimicrobial System*. Bath: Bath University Press, 1986: 11–28.
18. Hoesl C.E., Altwein J.E. The probiotic approach treatment option in urology // *Eur. Urol.*, 2005. 47: 288–296.
19. Reid G. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. *FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Cordoba, Argentina. 2001: 1–34.
20. Tannok G.W. Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microflora. In: *Human Intestinal Microflora and Disease*. London: Acad. Press. 1983: 517–539.