

На правах рукописи

Петраков Евгений Сергеевич

**СТАНОВЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА,
ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ
У ТЕЛЯТ, ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НОВЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ
ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ**

03.03.01 - физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук.

Боровск, 2010

Диссертационная работа выполнена в лаборатории биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Тараканов Борис Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Харитонов Леонид Васильевич
доктор биологических наук
Фомичев Юрий Павлович

Ведущая организация: Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина

Защита состоится 24 ноября 2010 года в часов на заседании диссертационного совета Д 006.030.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных.

Адрес института: 249013, Калужская область, г. Боровск, пос. Институт, ВНИИФБиП с.-х. животных. Телефон 8(495)9963415, факс 8(48438)42088

Автореферат диссертации разослан 22 октября 2010 года и размещен на официальном сайте института www.bifip2006.narod.ru 22 октября 2010 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

В.П. Лазаренко

1. Общая характеристика работы

Актуальность работы. Одним из наиболее эффективных методов профилактики дисбактериозов у молодняка с.-х. животных является использование заместительной терапии, направленной на восстановление кишечного биоценоза путем регулярного введения живых бактерий – представителей нормальной кишечной микрофлоры, получивших название пробиотиков.

Пробиотики нормализуют состав микробиоценоза кишечника, за счет сдерживания размножения патогенных и условно-патогенных микробов, что является важным фактором защиты организма от развития кишечных инфекций. Оказывают стимулирующее влияние на иммунологический статус. Увеличивается количество Т-лимфоцитов, активизируется функция В-лимфоцитов, повышается фагоцитарная активность нейтрофилов, стимулируется синтез иммуноглобулинов различных классов, что приводит, в конечном итоге, к увеличению резистентности и повышению интенсивности роста животных.

К пробиотическим микроорганизмам предъявляется ряд требований, такие как антагонизм по отношению к потенциальным патогенам, толерантность к неблагоприятным факторам пищеварительного тракта, способность к адгезии на эпителии слизистой кишечника и др. Но для проявления положительного влияния пробиотика на макроорганизм крайне желательно, чтобы микроорганизмы, обладающие полезными свойствами, подтвержденными лабораторными испытаниями, были изолированы из нормальной микрофлоры тех видов животных, для которых создается пробиотик. Создание новых эффективных пробиотических препаратов для телят требует выделения штаммов от молодняка крупного рогатого скота и оценки их влияния на ряд физиологических показателей животных.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выделение новых штаммов лактобацилл с пробиотическими

характеристиками и оценка их влияния на становление микробиоценоза пищеварительного тракта, морфологическую картину крови, неспецифическую резистентность и интенсивность роста у телят.

Были поставлены следующие задачи:

1. Выделить из пищеварительного тракта телят лактобациллы и отобрать штаммы, наиболее полно отвечающие требованиям предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам;
2. Изучить становление микробиоценоза кишечника телят, при введении в рацион выделенных штаммов лактобацилл на протяжении первого месяца жизни;
3. Определить неспецифическую резистентность и морфологические показатели крови телят, после использования выделенных штаммов лактобацилл на протяжении первого месяца жизни;
4. Сравнить интенсивность роста телят, получающих добавку из пробиотических лактобацилл, с их сверстниками.

Научная новизна работы. Впервые из пищеварительного тракта телят выделены гетероферментативные лактобациллы с высокой антагонистической активностью против потенциальных патогенов, устойчивые к неблагоприятным факторам кишечника и безвредные для животных. Изучены штаммы *L. fermentum* В238/06 и В395/06, использование которых обеспечивает оптимизацию нормального микробного баланса в кишечнике, ингибирование роста потенциальных патогенов, повышение неспецифической резистентности организма и снижение продолжительности расстройств функций пищеварения, сопровождающихся диарейным синдромом, у телят.

Практическая значимость работы. Применение выделенных штаммов антагонистических лактобацилл в качестве пробиотических у телят первого месяца жизни позволило повысить среднесуточные приросты живой массы на 22% и сократить среднюю продолжительность расстройств

пищеварительной системы в расчете на одну голову практически на 40%, что говорит о высокой эффективности применения данных штаммов у молодняка жвачных животных и перспективности разработки препаратов – пробиотиков на их основе.

Положения, выносимые на защиту

1. Из содержимого кишечника телят выделены новые штаммы *L. fermentum* В238/06 и В395/06, отвечающие всем требованиям, предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам;
2. Введение в рацион телят этих штаммов лактобацилл, в физиологически оправданных дозировках, оказывает оптимизирующее действие на становление кишечной микрофлоры и неспецифическую резистентность у телят;
3. Совместное применение штаммов *Lactobacillus fermentum* В238/06 и В395/06 существенно увеличивает их профилактическую эффективность при расстройствах функций пищеварения телят и прирост их живой массы в сравнении с отдельным использованием штаммов.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований доложены: на региональной научно - практической конференции «Использование инновационных разработок НИУ региона для повышения эффективности сельскохозяйственного производства», (Калуга, 2010); международной научно – практической конференции «Физиологические механизмы становления и поддержания функций организма», (Сухум, 2010); XXI съезде физиологического общества им.И.П. Павлова, (Калуга, 2010).

Структура диссертации. Диссертация изложена на 111 стр., содержит 11 таблиц, 4 рисунка. Включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, выводы, предложения практике и список литературы, включающий 190 источников, в том числе 90 иностранных.

2. Материалы и методы исследований

Для выделения чистых культур *Lactobacillus spp.* использовали фекалии телят, полученные при акте вынужденной дефекации. Отбор фекалий проводили в опытном хозяйстве «Ермолино», Калужской области. Из 10 – граммовых навесок фекалий готовили серийные разведения на стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и производили посев в агаризованную среду Рогозы в модификации Тараканова, селективную для лактобацилл (Тараканов Б.В., 2006). После культивирования в термостате в течение 72 часов при температуре 39°C выросшие изолированно колонии пересеивали в жидкую среду МРС, приготовленную по прописи De Mann J.C., Rogosa M., Sharpe M.E., 1960. Одним из важных признаков при идентификации лактобацилл является отсутствие у них каталазы, которую тестировали с использованием набора для определения каталазы (производство НИЦФ, г. Санкт-Петербург). Все выделенные культуры были первично идентифицированы как *Lactobacillus spp.* по морфологии клеток при микроскопии (неподвижные, грамположительные палочки), отсутствии спорообразования и каталазы, специфических потребностях в ростовых веществах.

Штаммы молочнокислых микроорганизмов, которые непосредственно использовали в исследованиях, поддерживали и сохраняли в среде Рогозы в модификации Тараканова. Культуры хранили в холодильнике при температуре 4-8°C и пересеивали ежемесячно.

Изучение антибактериальных свойств лактобацилл проводили методом отсроченного антагонизма в двухслойном агаре. Для установления штаммов, продуцирующих в качестве антибактериальных веществ микроцины (бактериоцины с низкой молекулярной массой), использовали методику, описанную Хмель И.А. с соавторами (Хмель И.А., Манохина И.М., Басюк Е.И. и др., 1993). В качестве индикаторных культур использовали штаммы дикого типа: 10 штаммов *Escherichia coli spp.* и 9 штаммов *Salmonella spp.*,

выделенных от свиней, 10 штаммов *Staphylococcus spp.* и 10 штаммов *Enterococcus spp.*, выделенных от мышей, а также музейные штаммы: *Salmonella rostock*, *S. derby*, *S. thyphimurium colE1*, *S. utrecht*, *S. london 1446*, *S. dublin 42*, *S. bovis morbipicans 988*, *S. give*, *S. heidelberg 287*, *S. kirkae*, *S. stanly*, *Escherichia coli 113-3*, *E. coli K-12 W-3350*, *E. coli K-88*, *E. coli 817-020*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis OG-1*.

Процессы адгезии изучали по методике Брилис с соавторами (Брилис В.И., Брилине Т.А. и др. 1986), на дважды отмытых в фосфатном буфере эритроцитах телят. Чувствительность к антимикробным веществам у выделенных микроорганизмов определяли методом диффузии в агаре в соответствии с общепринятыми методиками (с помощью стандартных дисков производства НИЦФ, г. Санкт-Петербург). Для изучения толерантности выделенных лактобацилл к неблагоприятным факторам желудочно-кишечного тракта в опытные пробирки с 5мл среды МРС вносили: желчь для получения следующих концентраций - 20% и 40%, этанол для получения концентрации в 2%, 4%, 6% и 8%, 0,2% фенола, NaCl в концентрации 2%, 4% и 6%. Суточную бульонную культуру добавляли по 0,5 мл в каждую из опытных пробирок, культивировали при температуре 39°C. Через 24 часа фиксировали наличие или отсутствие роста.

Исследования на выживаемость лактобацилл в искусственном желудочном соке проводили по методике, описанной Casey P.G. et al. (2004). Окончательную идентификацию изолятов осуществляли с помощью тест-системы для биохимической идентификации бактерий до вида API-50, производства БиоМерье (Франция), с использованием программного обеспечения arıweb – API 50 CHL V5.0.

Оценку влияния антагонистических лактобацилл на становление микрофлоры кишечника, неспецифическую резистентность и роста животных проводили в научно-хозяйственных опытах. Первый опыт проводился с февраля по апрель 2009 года на центральной ферме ОПХ

«Ермолино» (Калужская область), в период массовых отелов на телятах холмогорской породы. На ферме имеется родильное отделение и профилакторий для новорожденных. В 3-х дневном возрасте телят переводили в индивидуальные домики, расположенные на открытом воздухе. Уход за телятами и их кормление осуществлялось в соответствии со схемами и требованиями, принятыми в хозяйстве. Ежедневно телята получали не менее 5 литров цельного молока, на седьмой день начинали вводить заменитель цельного молока «Кормилак», на десятый концентраты.

Контрольную и две опытные группы формировали по методу пар - аналогов (Овсянников А.И., 1976) по мере рождения телят. В каждую группу набирали по семь голов, по три бычка и четыре телочки. Различия по средней массе животных между группами не превышали пяти процентов.

Для оптимизации микробиоценоза кишечника новорожденным телятам опытных групп выпаивали ежедневно, однократно, по 50 мл культуры, содержащей в среднем по 3×10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ) в одном миллилитре, то есть по $1,5 \times 10^{10}$ живых микробных клеток на голову. Животные 2-й группы получали штамм *L. fermentum* B238/06, а третьей группы – штамм *L. fermentum* B395/06.

Учитывали день возникновения расстройств пищеварения, сопровождающихся диареей, и их продолжительность, сохранность телят и прирост массы тела в течение первого месяца жизни.

Контроль за состоянием микрофлоры пищеварительного тракта осуществляли путем микробиологических исследований фекалий, которые получали при акте вынужденной дефекации. Отбор проб проводили на 10-й, 20-й и 30-й день опыта. Изучалось количественное содержание в химусе сальмонелл, эшерихий, протеев, грибов рода кандиды, бифидо- и лактобактерий.

Для изучения неспецифической резистентности на 30-й день опыта у животных контрольной и опытных групп брали пробы крови. Определяли:

фагоцитарную активность клеток крови по Кост и Стенко (Кондрахин И.П., 2004), бактерицидную активность сыворотки крови по модифицированному методу Бухарина и Созыкина (Саруханов В.Я. с соавт., 2007), содержание лизоцима по методу Емельяненко (1980).

Количество эритроцитов и лейкоцитов определяли на гематологическом анализаторе Stat fax 1904 Plus Biochemistry Photometer (USA). Лейкограмму выводили путем микроскопии мазков крови, приготовленных общепринятыми методами и окрашенных по Романовскому-Гимза.

Уровень гемоглобина определяли гемиглобинцианидным колориметрическим методом.

Второй научно – хозяйственный опыт был проведен в 2010 году, с 1 марта по 24 мая, в том же хозяйстве. Изучалась возможность включения смеси антагонистических лактобацилл штаммов *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06 в схему кормления телят, в качестве пробиотика.

Для проведения опыта, по мере рождения телят, было сформировано три группы животных по методу сбалансированных групп – аналогов (Овсянников А.И., 1976). Аналогичность групп определялась фенотипическими качествами, соблюдалась через исходные средние показатели по группам в целом (пол, живой вес, возраст, физиологическое состояние). В каждую группу набирали по 20 животных, по 10 бычков и телочек. Учитывали приросты живой массы, фиксировали данные по нарушению нормального функционирования пищеварительной системы. Первая опытная группа в дополнение к основному рациону, получала ежедневно по 50 мл смеси антагонистических культур лактобацилл *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06, в пропорции 1:1, с титром живых микробных тел в миллилитре в среднем $4,5 \times 10^9$, выращенных в среде, содержащей 10% сухого обезжиренного молока. Вторая опытная группа получала в дополнение к основному рациону по 50 мл пробиотика «Лактоамиловорин». Третья группа являлась контрольной и получала

основной рацион, принятый в хозяйстве и аналогичный по составу с первым опытом.

Для оценки достоверности различий межгрупповых средних использовали *t*-критерий (Плохинский Н.А., 1980).

3. Результаты собственных исследований

3.1 Биология гетероферментативных лактобацилл пищеварительного тракта телят

3.1.1 Выделение лактобацилл из кишечника телят и их скрининг на антагонизм

Для изучения было выделено 150 микробных культур, от 10 животных, дополнительно было получено 50 культур ранее изолированных профессором Б.В. Таракановым. Все выделенные на селективных средах штаммы представляли собой грамположительные палочки, каталазонегативные, неспорообразующие и были первично идентифицированы как лактобациллы, с присвоением названия *Lactobacillus spp.* В№, где №-номер данный при выделении (сокращенное обозначение LBВ№).

Первичный скрининг на антагонизм показал, что антагонистической активностью обладали только 24 штамма. При этом штаммов, продуцирующих низкомолекулярные антибиотикоподобные субстанции – микроцины не было выявлено. При дальнейшем изучении ингибирующих способностей в отношении эшерихий, сальмонелл, стафилококков и энтерококков дикого типа, из этих 24 штаммов было отобрано 9, обладающих более широким спектром подавления роста возможных патогенов, которые и были изучены более детально.

Все 9 штаммов подавляли рост сальмонелл дикого типа в 100% случаев, ингибировали не менее 90% от использованных в качестве индикаторных штаммов кишечной палочки и не менее 80% стафилококков и энтерококков

Таблица 1. Антагонистическая активность лактобацилл по отношению к коллекционным индикаторным культурам

Тест-культуры	Исучаемые лактобациллы								
	LBB 5/08	LBB 21/08	LBB 238/ 06	LBB 349/ 06	LBB 355/ 06	LBB 387/ 06	LBB 388/ 06	LBB 390/ 06	LBB 395/ 06
<i>Salmonella rostok</i>	23	21	-	-	17	-	-	-	28
<i>Salmonella derby</i>	24	-	23	-	-	-	27	18	30
<i>Salmonella typhimurium col E1J</i>	20	18	27	-	20	32	33	-	26
<i>Salmonella utrecht</i>	29	22	16	-	18	-	20	-	14
<i>Salmonella london 1446</i>	32	-	30	30	20	-	32	-	20
<i>Salmonella dublin 42</i>	30	-	27	21	-	30	30	-	24
<i>Salmonella bovis morbipicans 988</i>	26	-	41	-	-	-	30	40	40
<i>Salmonella give</i>	38	42	39	40	39	42	42	-	-
<i>Salmonella heidelberg 287</i>	40	37	-	41	39	40	42	38	39
<i>Salmonella kirkae</i>	42	42	34	38	40	41	42	40	41
<i>Salmonella stanly</i>	41	34	22	21	24	39	38	41	42
<i>Escherichia coli K-12 W-3350</i>	39	40	48	41	40	39	40	42	40
<i>Escherichia coli K-88</i>	23	20	29	40	36	42	42	39	41
<i>Escherichia coli 817-020</i>	40	40	39	24	30	41	39	40	42
<i>Micrococcus luteus</i>	24	40	36	39	41	42	40	29	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	11	12	16	12	11	17	10	19
<i>Streptococcus faecalis OG-1</i>	11	16	14	11	14	15	13	12	10
<i>Klebsiella 4140 (K-7)</i>	19	17	24	21	24	26	16	10	26

Примечание: Цифра показывает диаметр зоны подавления роста тест-культуры в мм

дикого типа. Результаты скрининга на антагонизм в отношении коллекционных культур представлены в таблице 1. В качестве индикаторных культур для изучения ингибирующих способностей лактобацилл нами использовались как грамположительные (*Micrococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*), так и грамотрицательные микроорганизмы

(*Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*). Это связано с различным механизмом подавления роста микроорганизмов лактобациллами. Так, ингибирующее воздействие на грамотрицательную микрофлору обусловлено, в основном, продукцией молочной кислоты. В то время как антагонизм по отношению к грамположительным микроорганизмам проявляется за счет продукции антибиотикоподобных субстанций – бактериоцинов, микроцинов и др.

3.1.2 Адгезия лактобацилл

Многие исследователи (Зинченко Е.В., Панин А.Н., 2000; Шендеров Б.А., 1998; Barrow P.A. et al., 1980) считают, что благоприятная колонизация кишечника задаваемыми пробиотическими штаммами возможна только в том случае, когда они обладают высокими показателями адгезии к энтероцитам животного – хозяина.

В этой связи, следующим этапом исследований стало изучение адгезивных способностей у высоко антагонистически активных представителей молочнокислых микроорганизмов. В связи с трудностью получения от телят клеток кишечника, пригодных для исследований, мы использовали отмытые в фосфатном буфере эритроциты. Кроме простоты получения в необходимых количествах, важное значение имеют их структурные особенности. На поверхности эритроцитов расположен гликофорин – вещество, идентичное гликокаликсу эпителиальных клеток, на котором расположены рецепторы для адгезинов микробов. Обработка полученных результатов показала, что все 9 штаммов являются высокоадгезивными (табл. 2). Однако индивидуальные различия индекса адгезивности варьировали в довольно больших пределах, от 5,0 до 7,61, что, вероятно, обусловлено особенностями строения и количества адгезинов на микробной стенке.

Микроорганизм считают неадгезивным при индексе адгезивности $\leq 1,75$, низкоадгезивным – от 1,76 до 2,5, среднеадгезивным – от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивным при ИАМ выше 4,0.

Таблица 2. Показатели адгезии лактобацилл

Показатели*	Изучаемые лактобациллы								
	LBB 5/08	LBB 21/08	LBB 238/06	LBB 349/06	LBB 355/06	LBB 387/06	LBB 388/06	LBB 390/06	LBB 395/06
СПА	2,08	1,42	2,36	2,42	1,64	2,1	2,54	1,98	2,68
К	38	27,2	36	40	32,8	36,4	34,4	38,4	35,2
ИАМ	5,47	5,22	6,55	6,05	5	5,77	7,38	5,16	7,61

*Примечание: в таблице СПА- средний показатель адгезии, показывает среднее количество микроорганизмов прикрепившихся к одному эритроциту. К- коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе, показывает количество эритроцитов, имеющих на клеточной стенке прикрепившиеся микроорганизмы, в процентах от общего числа эритроцитов. ИАМ- индекс адгезивности микроорганизма. Высчитывается по формуле: $ИАМ = СПА \times 100 / К$.

3.1.3 Толерантность лактобацилл к неблагоприятным факторам пищеварительного тракта

Немаловажное значение для прохождения в дистальные отделы кишечника придается устойчивости пробиотических микроорганизмов к действию желудочного сока, желчных кислот и других повреждающих агентов (Червинец Ю.В. и др., 2006; Sanders J.W. et al., 1998; Corzo G., Gilliland S.E., 1999; Casey P.G. et al, 2004). Поэтому заключительным этапом при отборе лактобацилл, имеющих в перспективе производственное значение, являлось изучение их толерантности к неблагоприятным факторам желудочно – кишечного тракта. При изучении роста выделенных культур в условиях желудочно-кишечного тракта было установлено: все 9 культур хорошо росли в присутствии 0,2% фенола, 20% и 40% желчи; этанол не влиял на рост лактобацилл при повышении концентрации до 6%; 2,4% NaCl не останавливали роста бактерий. Данные по устойчивости лактобацилл к

неблагоприятным условиям, по которым получены переменные результаты, приведены в таблице 3.

Следует отметить, что при изучении роста тестируемых культур в условиях высокого осмотического давления (2, 4 и 6% NaCl), присутствии этанола, фенола, желчи, различия в ростовых характеристиках были не значительны. Совсем другая картина наблюдалась при исследовании выживаемости в искусственном желудочном соке, в состав которого дополнительно введена желчь. Выживаемость различных штаммов отличалась в десятки раз и составляла от 0,05% до 4,94% от первоначально внесенной концентрации бактерий.

Таблица 3. Показатели роста лактобацилл при неблагоприятных условиях

Показатель	Исследуемые лактобациллы								
	LBB 5/08	LBB 21/08	LBB 238/06	LBB 349/06	LBB 355/06	LBB 387/06	LBB 388/06	LBB 390/06	LBB 395/06
4% NaCl	+	-	+	+	-	+	+	+	+
6% NaCl	+	-	-	+	-	+	+	+	+
8% этанол	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Выживаемость в искусственном желудочном соке, %	4,94	0,025	0,71	0,016	1,143	0,05	0,364	0,359	0,569

Эти данные согласуются с результатами, полученными Casey P.G. et al. (2004), при изучении выживаемости различных видов лактобацилл в условиях желудочного сока. Вероятно, столь сильное подавление жизнедеятельности микробных культур объясняется комплексным воздействием на них высокой кислотности, желудочных ферментов и желчи.

3.1.6 Чувствительность к антибиотикам

Наиболее целесообразно применение пробиотических препаратов в качестве профилактического средства с первых дней жизни для становления нормальной микрофлоры пищеварительного тракта. Несмотря на то, что

лактобактерии проявляют антагонистическое действие по отношению к патогенным микроорганизмам, их применение в качестве лекарственного средства не оправдано.

Это связано с тем, что для полноценного проявления благоприятного воздействия на организм необходимо время на колонизацию пищеварительного тракта. При различных пищевых токсикоинфекциях, дисбактериозах и заболеваниях со смешанной этиологией, транзит пищевых масс по кишечнику ускорен в связи с диарейным синдромом и времени на колонизацию недостаточно. В таких случаях показана антибиотикотерапия. Однако, как известно, антибиотики влияют не только на патогенную микрофлору, но в том числе и на бифидобактерии, лактобациллы и другие группы полезных микроорганизмов, что приводит ко вторичным дисбактериозам. Для избежания этого во время антибиотикотерапии рекомендуется вводить пробиотические микроорганизмы, устойчивые к используемым средствам и способствующие сохранению нормального микробиотопа в кишечнике. Показатели устойчивости выделенных лактобацилл к различным антимикробным препаратам показаны в таблице 4.

Проанализировав все полученные данные, мы пришли к выводу, что наиболее перспективными в качестве основы для создания пробиотиков для молодняка крупного рогатого скота являются штаммы *Lactobacillus spp. B238/06* и *Lactobacillus spp. B395/06*. Эти культуры показали широкий и сильный по действию спектр ингибиции потенциальных патогенов, обладали самыми высокими показателями адгезии, были толерантны к большинству неблагоприятных факторов пищеварительного тракта и имели высокий процент выживаемости в условиях желудочного сока. Оба штамма устойчивы к действию ванкомицина, канамицина, левофлоксацина, слабо подавляются тетрациклином и могут использоваться совместно с этими препаратами.

Окончательная идентификация этих штаммов до вида, проведенная с использованием тест-системы API-50, производимой фирмой БиоМерье (Франция), показала, что с достоверностью 93,9% исследуемые штаммы относятся к виду *Lactobacillus fermentum*.

Таблица 4. Показатели антибиотикорезистентности лактобацилл

Антибиотик, содержание в диске	Изучаемые лактобациллы								
	LBB 5/08	LBB 21/08	LBB 238/ 06	LBB 349/ 06	LBB 355/ 06	LBB 387/ 06	LBB 388/ 06	LBB 390/ 06	LBB 395/ 06
Тетрациклин, 30 мкг	3	-	≤1	9	8	9	9	≤1	6
Рифампицин, 5 мкг	18	16	17	15	12	18	13	15	11
Оксациллин, 10 мкг	6	3	6	7	5	3	3	3	5
Кларитромицин, 15 мкг	15	13	12	15	12	13	11	14	8
Клиндамицин, 2 мкг	15	15	17	13	16	18	13	14	12
Эритромицин, 15 мкг	12	10	12	9	8	10	9	8	8
Левомецетин, 30 мкг	17	-	15	13	12	14	14	13	12
Ванкомицин, 30 мкг	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Амикацин, 30 мкг	9	6	3	3	-	6	-	-	≤1
Стрептомицин, 30 мкг	9	5	3	2	-	7	-	-	-
Канамицин, 30 мкг	7	5	-	-	-	2	-	-	-
Неомицин, 30 мкг	5	4	2	2	-	8	-	2	3
Гентамицин, 120 мкг	8	8	4	6	3	7	5	4	4
Фурадонин, 300 мкг	15	16	12	20	15	19	21	1	22
Бензилпенициллин, 10 ЕД	21	20	19	26	20	27	28	14	26
Ампициллин, 10 мкг	20	20	21	26	21	28	27	19	27
Доксициклин, 30 мкг	1	1	-	23	18	22	22	-	20
Левифлоксацин, 5 мкг	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Ципрофлоксацин, 5 мкг	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Линезолид, 30 мкг	17	17	24	28	19	21	20	21	23
Меропенем, 10 мкг	20	21	26	32	24	35	30	25	32

Примечание: Цифра показывает диаметр зоны подавления роста лактобацилл в мм,

- наблюдается резистентность к антибиотику, хороший рост культуры

3.2 Воздействие *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06

на организм телят – молочников

3.2.1 Становление микрофлоры кишечника у телят

При проведении первого научно – хозяйственного опыта по изучению влияния выделенных нами лактобацилл (штаммы *L. fermentum* B238/06 и B395/06) на микрофлору кишечника, были зафиксированы различия по

изучаемым показателям между опытными и контрольной группой. Первая группа контрольная, вторая и третья получали соответственно *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06. Количественные результаты некоторых микробиологических показателей кишечника в различные периоды опыта, полученные при исследовании микрофлоры кишечника телят, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Количество микроорганизмов в фекалиях телят в различные периоды опыта, КОЕ/г

Группа микроорганизмов	День опыта	Группа животных		
		1 контрольная	2 OP+LBB 238/06	3 OP+LBB 395/06
Эшерихии, 10^7	10	16,4±0,7	4,9±1,0*	6,0±1,0*
	20	7,2±1,7	2,1±0,8*	7,3±2,5
	30	4,7±1,4	0,8±0,4*	3,8±1,8
Сальмонеллы, 10^3	10	5,6±2,4	7,3±3,1	3,1±0,3
	20	4,0±1,0	1,3±0,3*	1,8±0,3*
	30	13,0±3,2	1,3±0,6*	1,9±0,8*
Лактобациллы, 10^8	10	5,9±1,1	4,9±1,6	8,2±0,5
	20	0,4±0,2	4,3±0,6*	4,5±1,1*
	30	2,6±1,0	2,9±0,5	4,5±1,1*
Бифидобактерии, 10^8	10	4,1±1,8	2,9±1,1	6,6±0,9
	20	0,9±0,05	1,5±0,2*	2,7±0,5*
	30	1,8±0,5	3,2±1,0	5,2±1,5*

Примечание: Здесь и далее * P<0,05 по t-критерию при сравнении с контрольной группой.

По содержания бактерий рода *Proteus* и грибов рода *Candida* достоверных различий не было зафиксировано.

Как показали наши исследования, популяция кишечной палочки в пищеварительном тракте контрольной группы значительно превышала или находилась количественно на одном уровне с популяцией лактобацилл. Это не характерно для телят находящихся на молочном вскармливании и говорит о нарушениях условий содержания и кормления животных. Панин А.Н. и Малик Н.И. (2006) отмечают, что аналогичное изменение микрофлоры пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных,

характеризующееся значительным снижением уровня лакто- и бифидобактерий, присутствием спорообразующих бактерий, стафилококков, протей, плесневых и дрожжеподобных грибов, присущее интенсивным технологиям выращивания животных, искажающим процессы формирования кишечного микробиотопа у новорожденных. При этом, хотя численность кишечной палочки возрастает, количество эшерихий со сниженной ферментативной активностью может достигать 30-40%. Избыточное присутствие в составе кишечного биотопа условно – патогенной микрофлоры негативно сказывается на процессах микробного пищеварения и снижает усвоение кормов. Сбраживание углеводов энтеробактериями, клостридиями, гнилостными бактериями и плесневыми грибами происходит по типу уксуснокислого и маслянокислого брожения, снижающего энергетическую ценность корма. Побочные продукты метаболизма условно – патогенных бактерий и плесневых грибов – биогенные амины и микотоксины в высокой мере токсичны для теплокровных животных. Учитывая, что часть энергии рациона расходуется на поддержание жизнедеятельности кишечной микрофлоры, потери энергии при негативном изменении состава кишечного микробиотопа бывают ощутимы (Панин А.Н., Малик Н.И., 2006).

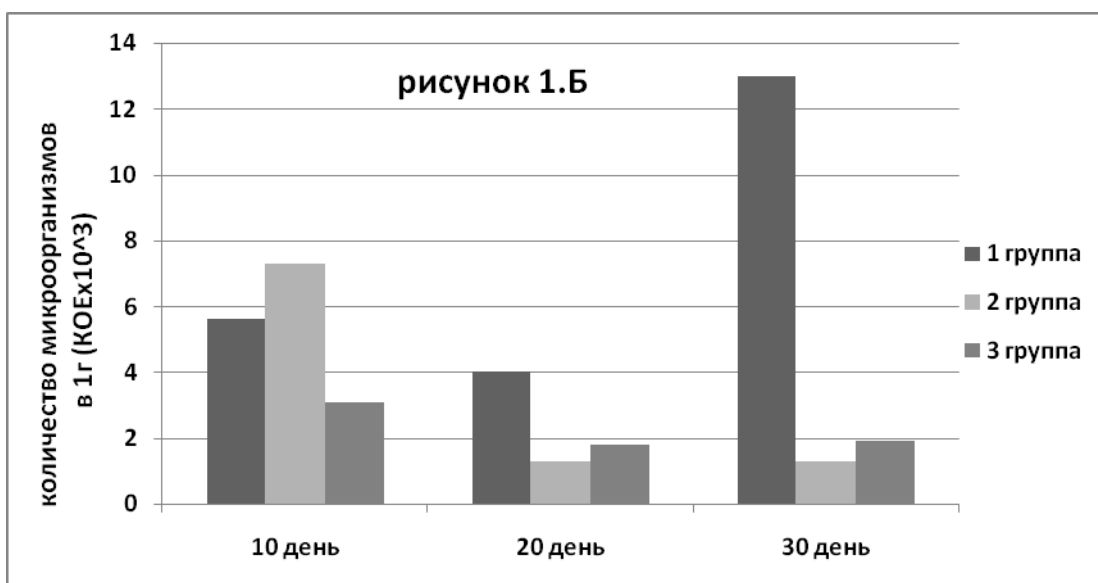
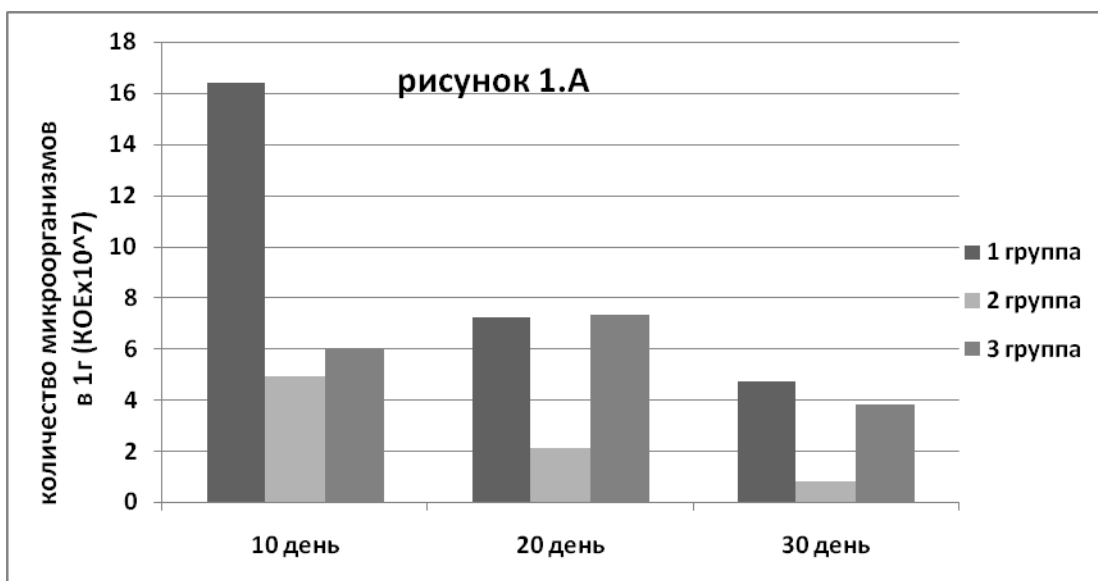
Применение гетероферментативных лактобацилл вида *Lactobacillus fermentum*, выделенных нами в ходе исследований и обладающих способностью ингибировать рост многих видов возможных патогенов, позволило оптимизировать микрофлору пищеварительного тракта. Уровень бифидобактерий и лактобацилл значительно возрос, на фоне одновременного снижения количества кишечной палочки и сальмонелл. При использовании штамма *L. fermentum* B238/06 на протяжении 30 дней уровень эшерихий и сальмонелл составил 16% и 10% соответственно, в сравнение с контролем. Использование штамма *L. fermentum* B395/06, в такой же период, позволило снизить уровень потенциально опасных групп микроорганизмов, однако их количество оказалось выше и составляло 81% и 15% от количества эшерихий

и сальмонелл соответственно в содержимом дистальных отделов кишечника контрольной группы. В то же время, при оценке влияния данных штаммов на би-фидобактерии и лактобациллы оказалось, что применение *L. fermentum* B395/06 позволило повысить их количество на 288% и 173% соответственно, а при использовании *L. fermentum* B238/06 эти показатели были ниже и составляли 177% и 111% соответственно, в сравнении с контролем.

Для сравнения возрастной динамики изменений микрофлоры пищеварительного тракта полученные данные были отображены в рисунках 1 и 2. При сравнении возрастной динамики изменений микрофлоры пищеварительного тракта видно, что тенденции возрастных изменений различных видов микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры, во всех группах схожи. Так, во всех трех группах наиболее высокое содержание эшерихий было зафиксировано на 10-й день опыта с постепенным снижением их количества к месячному возрасту. Мы объясняем это особенностями содержания телят: первые три дня жизни телята находятся в одном помещении со взрослыми животными различных физиологических состояний и в это время наблюдается высокое обсеменение их организма потенциально патогенной микрофлорой. При переводе на содержание на открытом воздухе с учетом низких температур, характерных для этого времени года, уровень микробного загрязнения окружающей среды значительно уменьшается, контакт с поголовьем других возрастов отсутствует, что приводит к снижению количества этих микробов в организме телят. Наблюдается естественная санация организма, но под влиянием введения в организм животных антагонистических лактобацилл этот процесс протекает интенсивнее. Подобная ситуация наблюдается и при учете сальмонелл. Резкий скачок их количества в контрольной группе на 30-й день опыта вероятно обусловлен введением в рацион недоброкачественных кормов. В опытных группах этого не произошло благодаря

профилактическому применению пробиотических микроорганизмов на протяжении месяца.

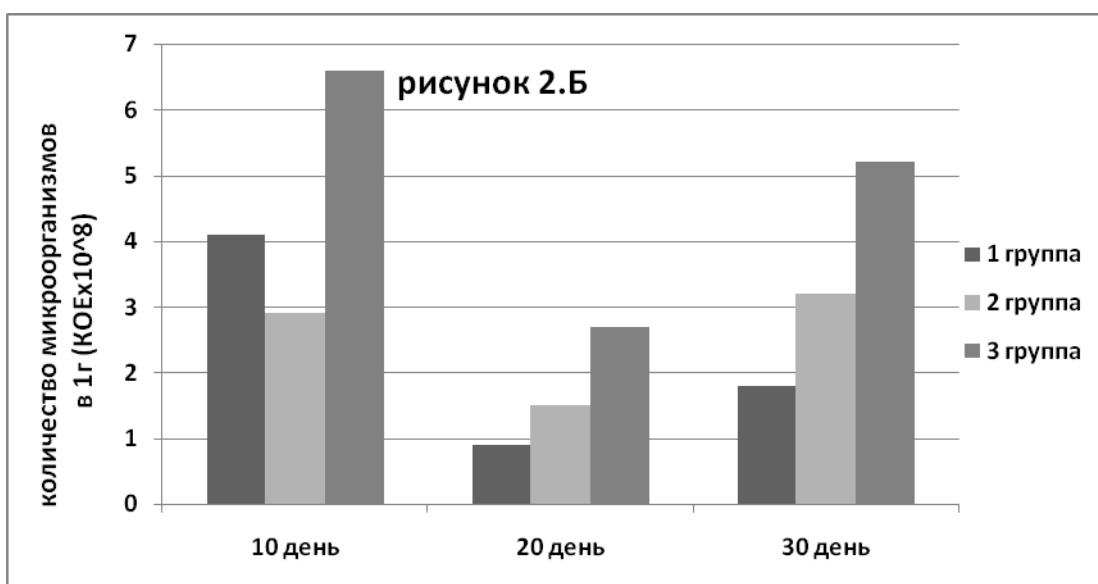
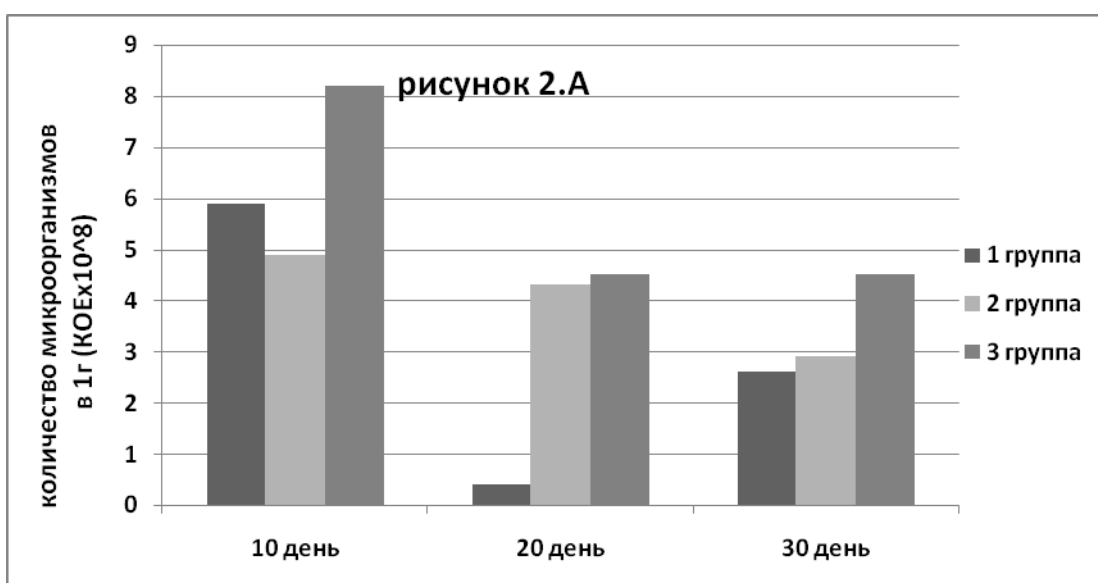
Рисунок 1. Содержание в фекалиях телят: А – эшерихий, Б-сальмонелл



Во всех группах наиболее высокие показатели по содержанию бифидо- и лактобактерий, наблюдались на 10-й день, затем было некоторое снижение их количества к 20-му дню с последующим ростом. Это можно объяснить особенностями питания. В первые дни теленок получает коровье молозиво и молоко, и в эти дни наблюдается самое высокое содержание молочнокислых микроорганизмов. При введении в рацион заменителей цельного молока (ЗЦМ) на седьмой день жизни и концентратов на десятый, их количество в

кишечном тракте снижается. Так же следует учитывать, что в состав заменителя цельного молока («Кормилак»), используемого в хозяйстве, входит концентрат соевого белка, который не образует сгустка в сычуге. Это может спровоцировать ускоренное прохождение химуса по пищеварительному тракту. Однако, с постепенной адаптацией организма к новому продукту их уровни постепенно увеличиваются.

Рисунок 2. Содержание в фекалиях телят: А – лактобацилл, Б – бифидобактерий



3.2.2 Влияние лактобацилл на гематологические показатели, неспецифическую резистентность и рост животных

Немаловажный интерес представляло влияние этих штаммов на иммунную систему молодняка крупного рогатого скота, в частности на некоторые показатели неспецифической резистентности. Имеются многочисленные сведения о способности лактобацилл влиять на систему иммунитета, которое проявляется в стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов, макрофагов, синтеза иммуноглобулинов, образования интерферонов, интерлейкинов и фактора некроза опухолей (Цой И.Г. и др., 1994; Иммунобиологические препараты..., 2002; Marteau P., Rambaud J., 1993; Schiffrin E.J. et al., 1995). По данным Лопатиной Т.К. и др. (1997), представители рода *Lactobacillus* стимулируют подавленную иммунную систему и не влияют на иммунную систему находящуюся в нормальном состоянии.

Они способны стимулировать систему перитонеальных макрофагов, активировать клетки и структуры, связанные с морфологическим субстратом клеточного иммунитета (Ленцнер А.А. и др., 1987; Saito Hajime et al., 1986). Наши исследования подтвердили, что вышеперечисленное полностью относится и к виду *Lactobacillus fermentum*.

Показатели крови показаны в таблице 6. Все показатели находятся в пределах физиологической нормы. Следует отметить достоверное повышение содержания гемоглобина в крови животных опытных групп. Вероятно это можно объяснить несколькими причинами. Так, продукты метаболизма лактобацилл катализируют бактерицидную и ферментную активность лактопероксидазной системы молока, повышая ее защитные функции (Reiter B. et al., 1980). При этом, лактоферрин, входящий в лактопероксидазную систему, может конкурировать с микробными клетками за органически связанное железо и ограничивать рост железозависимых

микроорганизмов, повышая количество железа, всосавшееся в кровь и необходимое для построения гемоглобина.

Немаловажным представляется так же то, что введение пробиотических лактобацилл снизило, количественно, популяцию протеолитических микроорганизмов, одним из конечных продуктов метаболизма которых являются биогенные амины, ингибирующие деятельность многих систем, в том числе и эритропоэз. За счет этого, опосредованно, произошла оптимизация кроветворения и повышение уровня гемоглобина в крови, но в пределах физиологической нормы.

Таблица 6. Гематологические показатели у подопытных телят в 30-дневном возрасте

Показатель	Группа животных		
	1 контрольная	2 OP+LBB 238/06	3 OP+LBB 395/06
Эритроциты, млн/мкл	7,86±0,27	7,89±0,191	8,14±0,37
Лейкоциты, тыс/мкл	4,86±0,27	4,24±0,21	3,3±0,15*
Гемоглобин, г/л	90,44±3,79	101,34±2,44*	111,36±3,93*
Лейкоцитарная формула, %:			
базофилы	1,6	1,2	1
эозинофилы	1	1,4	1,6
Нейтрофилы:			
юные	-	-	-
палочкоядерные	14,2	12	8,4
сегментоядерные	33,2	21,2	22
лимфоциты	42,4	58,4	61,4
моноциты	7,6	7,6	6,6

Что касается лейкоцитарной формулы, то во всех группах она соответствовала лейкограмме здоровых животных, но в опытных группах повысилась доля лимфоцитов за счет снижения доли сегментоядерных нейтрофилов.

Показатели неспецифической резистентности телят приведены в таблице 7. Как видно из таблицы, в опытных группах, получавших в течение месяца штаммы *L. fermentum* B238/06 и B395/06, фагоцитарная активность

нейтрофилов и макрофагов повысилась на 53% и 18,3% соответственно, в сравнении с контрольной группой. Общая бактерицидная активность сыворотки крови так же возросла, но разница с контролем была не столь существенна и составляла 6,7% и 3,6% соответственно.

Таблица 7. Показатели неспецифической резистентности у телят в 30-дневном возрасте.

Показатель	Группа животных		
	1 контрольная	2 OP+LBB 238/06	3 OP+LBB 395/06
Фагоцитарная активность, %	23±3	35,2±3,19	27,2±4,79
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	84,17±4,04	89,78±1,56	87,23±2,85
Лизоцим сыворотки крови, мкг/мл	17±0,7	35±1,2*	40±2,1*

По данным Денисенко В.Н. (1976), среднее количество лизоцима в сыворотке крови телят холмогорской породы месячного возраста составляет $15,41 \pm 1,74$ мкг/мл. Таким образом, в контрольной группе уровень лизоцима находился в пределах нормы (17 мкг/мл). Однако, в опытных группах количество лизоцима, установленное в сыворотке крови, превышало этот показатель более чем в два раза и составляло $35 \pm 1,2$ мкг/мл для группы, получавшей *L. fermentum* B238/06, и $40 \pm 2,1$ мкг/мл для группы, которой давали *L. fermentum* B395/06. Вероятно, определенную роль в этом сыграло то, что по данным Глушановой Н.А. (2003), Ленцнера А.А. и др. (1987), Максимова В.И. и др. (1988), лактобациллы могут продуцировать лизоцим и выделять его в окружающую среду. Возможно, кроме стимуляции собственно лизоцим – продуцирующих клеток организма телят, небольшое количество микробного лизоцима могло всасываться в кровь и циркулировать в кровеносном русле.

Оптимизация микробиоценоза кишечника, повышение иммунного статуса и увеличение содержания гемоглобина в крови животных 2-й и 3-й

групп (на 12% и 23% соответственно) привели к сокращению продолжительности нарушений функций пищеварения в расчете на одну голову, по сравнению с контролем, во 2-й группе на 13,6%, а в 3-й группе на 50%, что благоприятно отразилось на росте молодняка и существенно повысило среднесуточные приросты телят (табл. 8).

Таблица 8. Нарушения функций пищеварения и прирост живой массы подопытных телят

Показатель	Группа животных		
	1 контрольная	2 OP+LBB 238/06	3 OP+LBB 395/06
n, гол.	7	7	7
Количество животных имевших нарушения функций пищеварения, гол	3	4	3
Общая продолжительность, дней	16	18	8
Средняя продолжительность в расчете на одну голову, дн/гол	5,33	4,5	2,67
% к контролю	100	84,4	50,1
Живая масса в начале опыта, кг	27,1±0,2	26,9±0,2	27,6±0,3
В конце опыта, кг	46,6±0,3	50,4±0,8*	49,9±0,8*
Среднесуточный прирост	643±6	775±20*	733±25*
% к контролю	100	120,5	113,9

3.2.3 Эффективность совместного применения штаммов

Lactobacillus fermentum B238/06 и B395/06 при выращивании телят

Результаты научно – хозяйственного опыта показали, что выделенные штаммы лактобацилл *L. fermentum* B238/06 и B395/06 оказывают благотворное влияние на организм телят первого месяца жизни. Они способствуют становлению нормальной микрофлоры кишечника путем стимуляции развития популяций бифидобактерий и лактобацилл и

элиминации из биотопа сальмонелл и кишечной палочки, что приводит к более эффективному использованию энергии корма и, соответственно, увеличению среднесуточных привесов. Оказывают достоверное влияние на такие физиологические показатели как уровень гемоглобина и лизоцима в крови, общая бактерицидная активность сыворотки крови, фагоцитарная активность клеток крови. Однако, отобранные культуры оказывали разное по степени выраженности воздействие на баланс микрофлоры и защитные системы организма. Так, штамм *L. fermentum* В238/06 оказывал более выраженное ингибирующее действие на популяции эшерихий и сальмонелл кишечника, уровни фагоцитарной и бактерицидной активности крови при его применении были выше, чем при использовании *L. fermentum* В395/06. В то же время, штамм *L. fermentum* В395/06 более выраженно стимулировал увеличение количества бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике и концентрацию лизоцима в сыворотке крови. В связи с этим было решено соединить полезные качества каждого из штаммов используя их смесь в равной пропорции. Количество живых микробных клеток в 1 мл препарата было решено повысить до $4,5 \times 10^9$. Для сравнения эффективности положительного влияния на организм растущих телят выделенными штаммами вида *L. fermentum* с существующими препаратами, был выбран пробиотик «Лактоамиловорин». Основой данного пробиотика является штамм *Lactobacillus amylovorus* БТ-24/88. Препарат предназначен для телят при диарейных заболеваниях, нормализации микробного баланса в пищеварительном тракте и замены антибиотиков в стартерных комбикормах (Тараканов Б.В., 1998).

При проведении опыта учитывались показатели заболеваемости и приростов живой массы у телят. Результаты эксперимента приведены в таблице 9.

Как видно из таблицы, среднесуточные приросты телят, получавших на протяжении месяца смесь антагонистических лактобацилл *L. fermentum*

В238/06 и В395/06, на 22% превышали показатели контрольной группы. Продолжительность нарушений функций пищеварительного тракта составляла 60,4% от времени, в течение которого фиксировались аналогичные нарушения функций у телят контрольной группы.

Таблица 9. Нарушения функций пищеварения и прирост живой массы подопытных телят при проведении производственного опыта

Показатель	Группа животных		
	1 контрольная	2 ОР+ смесь штаммов	3 ОР+ «Лактоамиловорин»
п, гол.	20	20	20
Количество животных имевших нарушения функций пищеварения, гол	12	15	9
Общая продолжительность, дней	61	46	35
Средняя продолжительность в расчете на одну голову, дней	5,08	3,07	3,89
% к контролю	100	60,4	76,6
Живая масса: в начале опыта, кг	28,3±0,3	28,4±0,3	28,3±0,3
в конце опыта, кг	49,1±1,2	53,9±1,3	53,4±1,7
среднесуточный прирост, г	697	850	836
% к контролю	100	122	120

Эти показатели сопоставимы с данными, полученными при раздельном использовании этих штаммов, однако использование смеси исходных штаммов позволило получить более высокие среднесуточные приросты. Применение пробиотика «Лактоамиловорина» в такой же период, позволило получить увеличение среднесуточных приростов на 20%, и сокращение продолжительности болезни до 76,6%, в сравнение с контролем. Таким образом, при включении антагонистических лактобацилл штаммов *L. fermentum* В238/06 и В395/06 в технологическую схему кормления телят, с целью оптимизации микробиоценоза кишечника, иммуномодулирующего

воздействия и повышения их живой массы, полученные результаты были выше, чем при использовании зарегистрированного пробиотика «Лактоамиловорин».

4. Выводы

1. Из пищеварительного тракта клинически здоровых телят выделены и изучены новые штаммы лактобацилл, идентифицированные как *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06, отвечающие требованиям предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам.
2. Введение в рацион телят – молочников штаммов *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06, в течение первого месяца жизни животных, оказывает оптимизирующее влияние на становление микробиоценоза их кишечника, стимулируя развитие молочнокислых и бифидобактерий и уменьшая численность популяций сальмонелл и кишечной палочки.
3. Штаммы *Lactobacillus fermentum* B238/06 и B395/06 оказывают выраженное влияние на неспецифическую резистентность телят. Они достоверно повышают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов на 53%, общую бактерицидную активность сыворотки крови на 18,3% и более чем в два раза содержание лизоцима в крови. Отмечено достоверное увеличение содержание гемоглобина в крови животных опытных групп.
4. Повышение естественных защитных сил организма телят и оптимизация микробиоценоза кишечника приводит к сокращению продолжительности нарушений нормального функционирования пищеварительной системы. В совокупности с более полноценным использованием питательных веществ корма, за счет элиминации протеолитических микроорганизмов, это приводит к повышению среднесуточных приростов на 20,5%, в сравнении с контрольной группой.

5. Совместное применение штаммов *Lactobacillus fermentum* В238/06 и В395/06 существенно увеличивают профилактическую эффективность к расстройствам функций пищеварения телят и прирост их живой массы в сравнении с отдельным использованием штаммов. При этом продолжительность расстройств пищеварения телят удалось снизить на 39,6% и повысить среднесуточные приросты на 22%.

Предложения производству

Предлагается использовать выделенные штаммы лактобацилл в качестве основы для создания нового пробиотика для телят-молочников, для оптимизации микрофлоры пищеварительного тракта, повышения неспецифической резистентности и улучшения процессов пищеварения в кишечнике, что обеспечивает высокую продуктивность животных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Петраков Е.С., Тараканов Б.В. Воздействие пробиотических штаммов *Lactobacillus fermentum* на микрофлору кишечника, неспецифическую резистентность и рост телят-молочников // Проблемы биологии продуктивных животных, 2009, 4, 91-96.
2. Петраков Е.С. Биологическая характеристика лактобацилл, выделенных от телят с целью отбора пробиотических культур // Проблемы биологии продуктивных животных, 2010, 1, 111-117.
3. Петраков Е.С. Изменения кишечной микрофлоры при использовании пробиотических лактобацилл у телят // Молодой ученый, 2010, 9(20), 78-83.
4. Тараканов Б.В., Петраков Е.С. Эффективность использования *Lactobacillus fermentum* при выращивании телят молочников до месячного возраста // Материалы региональной научно-практической конференции по проблеме: «Использование инновационных разработок НИУ региона для повышения эффективности сельскохозяйственного производства» под ред.

- В.Н. Мазурова – Калуга: ГНУ Калужский НИИСХ
Россельхозакадемии. 2010, -с.151-155.
5. Петраков Е.С., Тараканов Б.В. Пробиотический потенциал двух штаммов *Lactobacillus fermentum* выделенных от телят // Материалы Международной научно-практической конференции «Физиологические механизмы становления и поддержания функций организма». –Сухум, 2010. –с.407.
6. Петраков Е.С. Влияние пробиотической культуры гетероферментативных лактобацилл на продуктивность и неспецифическую резистентность телят-молочников // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. –М. –Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. –с.475.