

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ ЧЕТЫРЁХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ТЕЛЯТ-МОЛОЧНИКОВ

Петраков Е.С., Овчарова А.Н., Софронова О.В., Андреева И.Н.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных,
Боровск Калужской обл., Российская Федерация;*

Цель работы: изучение эффективности действия лиофилизированной формы разрабатываемого пробиотика тетралактобактерина (ТЛБ) на телятах молочного периода выращивания. Опыт проведен на двух группах телят, по 10 бычков и телочек в каждой, в период выращивания со 1-го по 20-й день получавших основной рацион (ОР, контроль) и ОР +1 г сухого препарата ТЛБ с титром жизнеспособных клеток 5×10^{10} КОЕ/г 5 дней в неделю. Введение в рацион пробиотика оказало влияние на становление микробиоценоза пищеварительного тракта, что выразилось в существенном увеличении количества лактобацилл ($P < 0.05$) и снижении количества кишечной палочки. У животных экспериментальной группы показатели неспецифической резистентности (фагоцитарная и бактерицидная активность сыворотки крови, содержание лизоцима) были выше, чем в контроле ($P < 0.05$). У телят, получавших добавку ТЛБ, содержание мочевины было выше, чем у контрольных животных ($P < 0.05$), что указывает на повышенный метаболизм азотистых соединений. Более высокое содержание глюкозы в сыворотке ($P < 0.05$) в сравнении с контролем, вероятно, было обусловлено более интенсивной ферментацией углеводов корма в связи с заселением пищеварительного тракта лактобациллами, входящими в состав ТЛБ. Выявленные физиологические эффекты в совокупности обусловили повышение среднесуточных приростов живой массы телят за 50 дней наблюдений в опытной группе на 13%, по отношению к контрольной группе.

Ключевые слова: телята-молочники, пробиотики, лактобациллы, тетралактобактерин, резистентность

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 2: 94-100

Введение

При рождении желудочно-кишечный тракт является стерильным. Микроорганизмы, попадающие из окружающей среды, а также из вагинальной флоры во время родов, колонизируют желудочно-кишечный тракт новорожденных телят и остаются относительно стабильными на протяжении всей жизни, хотя определённые изменения, по-видимому, происходят периодически, особенно в период отъема и смены рациона (Conway, 1995). Трудно модифицировать энтеральную бактериальную флору после её стабилизации, однако временные модификации возможны в связи с использованием антибиотиков или пробиотиков (Saxelin et al., 1991; Sepp et al., 1993). Пробиотики определяются как живые микроорганизмы, которые при использовании в достаточных количествах оказывают положительное влияние на здоровье организма хозяина за счёт оптимизации функций микробиоценоза кишечника (Guarner, Schaafsma, 1998). Знание того, что нормальная кишечная флора участвует в формировании показывает защитной реакции против инфекции, обеспечивает основу для использования пробиотиков (Gorbach, McNaught, 2000, MacFie, 2001).

В лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП ранее была получена ассоциация из четырёх штаммов лактобацилл, выделенных из пищеварительного тракта телят, с рабочим названием тетралактобактерин. Входящие в состав пробиотика штаммы обладают широким спектром антагонистической активности против бактерий родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* и *Salmonella*, устойчивы к неблагоприятным условиям пищеварительного тракта и показывают высокий индекс адгезии к эпителиоцитам кишечника. Эти свойства характеризуют выбранные штаммы как перспективные для использования в качестве пробиотических при выращивании телят (Петраков, Петракова, 2013).

В рамках договора о творческом научном сотрудничестве с Брянской ГСХА в 2010-11 гг. в серии опытов было изучено влияние тетралактобактерина в жидкой форме на микробиоценоз кишечника, морфо-биохимические параметры крови и рост телят-молочников (Лифанова и др., 2012). При этом было установлено, что пробиотик с концентрацией живых микробных клеток 10^{10} в 1 мл не оказывал неблагоприятного воздействия на морфо-биохимические параметры крови, стабилизировал микробиоценоз кишечника, стимулировал неспецифическую резистентность и интенсивность роста животных.

С целью повышения технологической ценности тетралактобактерина, а именно – условий транспортировки, хранения, подбора доз и способа раздачи препарата, в 2012 г. в лаборатории была получена смесь культур в сухом (лиофилизированном) виде и проведен ряд экспериментов на лабораторных животных по изучению эффективности применения двух форм тетралактобактерина – сухой и жидкой. В 2012 году была проведена предварительная оценка эффективности использования лиофилизированной ассоциации лактобацилл в СПК «Родина» Красногорского района Брянской области на телятах черно-пестрой породы, где препарат показал высокую эффективность (Лифанова и др., 2012).

Цель данной работы – изучение эффективности действия лиофилизированной формы разрабатываемого пробиотика на телятах молочного периода выращивания.

Материал и методы

Опыт по изучению эффективности применения тетралактобактерина на телятах-молочниках был проведен во ФГУП «Ермолино» Калужской области. Из новорожденных телят сформировали две опытные группы по принципу групп-аналогов (Овсянников, 1976) по двадцать голов в каждой – по 10 бычков и 10 тёлочек. Первая (контрольная) группа получала основной рацион (ОР), принятый в хозяйстве. Животным опытной группы дополнительно к ОР на протяжении 20 дней задавали по 1 г сухого препарата с титром жизнеспособных клеток 5×10^{10} КОЕ/г 5 дней в неделю, то есть 15 доз.

На 20-й день опыта у пяти животных из каждой группы были взяты пробы фекалий и крови для лабораторных анализов. В фекалиях, полученных при акте вынужденной дефекации, определяли количественно содержание лактобацилл, бифидобактерий, сальмонелл, стафилококков, кишечной палочки и бактерий рода *Bacillus* культуральными методами на селективных средах.

Наблюдение за животными всех групп вели до достижения ими двухмесячного возраста. Учитывали следующие показатели: прирост живой массы, сохранность, экономическую эффективность.

Отбор проб крови у животных контрольной и опытной групп проводили утром до кормления. Взятие крови проводили с соблюдением правил асептики и антисептики в две стерильные пробирки. В одной из пробирок кровь стабилизировали ЭДТА, а другую использовали для получения сыворотки. Количество эритроцитов и лейкоцитов определяли подсчётом в камере Горяева, уровень гемоглобина определяли гемиглобинцианидным колориметрическим методом. Лейкограмму выводили путем микроскопии мазков крови, приготовленных общепринятыми методами и окрашенными по Романовскому-Гимза (Кондрахин, 2004). Определяли показатели неспецифической резистентности: фагоцитарную

активность клеток крови по Кост и Стенко (Блинов, 1983), бактерицидную активность сыворотки крови по модифицированному методу Бухарина и Созыкина (Саруханов и др., 2007), содержание лизоцима – по (Емельяненко, 1977).

Все биохимические показатели определяли на анализаторе ScreenMaster LIND113 (Hospitex Diagnostics, USA) с использованием наборов реагентов – альбумин, общий белок, креатинин, глюкоза мочевины производства ЗАО «Диакон-ДС» (Россия).

Результаты и обсуждение

Применение пробиотика на протяжении первых двадцати дней жизни телят оказало влияние на становление микробиоценоза пищеварительного тракта, что выразилось в существенном увеличении количества лактобацилл (более чем в четыре раза) и в трехкратном снижении количества кишечной палочки. Также была выявлена тенденция к повышению количества бифидобактерий и снижению сальмонелл и стафилококков у животных опытной группы (табл. 1). Анализируя сдвиги в составе микробиоты кишечника подопытных телят, трудно объяснить изменения, выявленные в группе бацилл (существенное увеличение количества), так как семейство бактерий группы *Bacillus* не является постоянным обитателем желудочно-кишечного тракта животных; основное их количество заносится туда вместе с сеном, в особенности, злаковым, и через непродолжительное время выводится из организма. Наиболее вероятным объяснением можно считать замену в рационе одной партии сена на следующую, с отличающимся количеством спорных форм бацилл на листьях.

Таблица 1. Микробиота кишечника телят (M+m, n=10)

Группы микроорганизмов	Количество микроорганизмов в 1 г содержимого	
	1 группа (контроль)	2 группа
Бифидобактерии, $\times 10^9$	1,3 \pm 0,5	2,6 \pm 1,1
Лактобактерии, $\times 10^8$	4,6 \pm 2,1	18,5 \pm 5,6*
Эшерихии, $\times 10^7$	16,6 \pm 2,9	5,2 \pm 1,6*
Энтерококки, $\times 10^8$	1,4 \pm 0,4	2,2 \pm 0,8
Сальмонелла, $\times 10^4$	0,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,5
Стафилококк, $\times 10^4$	4,1 \pm 1,1	2,2 \pm 0,5
Бациллы, $\times 10^4$	0,75 \pm 0,1	4,6 \pm 1,6*

Примечание: здесь и далее в таблицах: *P<0.05 по t-критерию при сравнении с контролем.

Гематологические исследования выявили, что все показатели находились в пределах физиологической нормы или имели незначительные отклонения, кроме уровня гемоглобина, который у животных обеих групп был ниже нормы (Кондрахин, 2004). Однако следует отметить более низкое количество лейкоцитов в крови животных, получавших пробиотик (табл. 2).

Таблица 2. Гематологические показатели телят (M+m, n=10)

Показатели	1 группа (контроль)	2 группа
Количество эритроцитов, млн/мкл	7,14 \pm 0,33	6,32 \pm 0,31
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	8,05 \pm 0,3	5,98 \pm 0,21*
Гемоглобин, г/л	95,1 \pm 4,69	82,8 \pm 2,82
Лейкоцитарная формула, %		
Базофилы	1,2	1,44
Эозинофилы	2,45	3,89
Нейтрофилы:		
палочкоядерные	1,5	1,33
сегментоядерные	29,55	29,89
Лимфоциты	60,85	58,89
Моноциты	4,3	4,56

Следует отметить, что процентное соотношение нейтрофилов в обеих группах находилось на одном уровне, но их количество в крови животных опытной группы меньше, чем в контроле. Однако, показатели неспецифической резистентности, за которые отвечают нейтрофилы (фагоцитарная активность и фагоцитарный индекс), у животных опытной группы были выше, чем в контроле (табл. 3). Вероятно, это объясняется значительным повышением микробицидной активности этих клеток крови под общим стимулирующим влиянием на иммунную систему организма препарата задаваемых лактобацилл. Также следует отметить повышение в опытной группе телят показателей неспецифической резистентности (общая бактерицидная активность сыворотки крови и содержание в ней лизоцима).

Таблица 3. Показатели неспецифической резистентности телят
(M+m, n=10)

Показатели	1 группа (контроль)	2 группа
Фагоцитарная активность, %	40,92±1,69	49,11±2,58*
Фагоцитарный индекс	4,47±0,13	4,88±0,18
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	21,07±3,59	52,02±2,16*
Содержание лизоцима в сыворотке крови, мкг/мкл	18,86±0,74	22,61±1,02*

Биохимический анализ сыворотки крови не выявил каких-либо различий по белковому составу (общий белок, альбуминовая и глобулиновые фракции) между группами (табл. 4). В то же время у телят, получавших микробную добавку, содержание мочевины было существенно выше, чем у контрольных животных, что говорит о высокой интенсивности метаболизма азотистых соединений, в том числе белков, под влиянием пробиотических лактобацилл.

Содержание глюкозы в сыворотке опытных телят также было выше, чем у контрольных животных. Глюкоза – главный источник энергии для клеток организма. На ее долю приходится более 90% всех низкомолекулярных углеводов. Лактобациллы, входящие в состав тетралактобактерина, обладают полисахаридазной активностью (LBR 1/90 и LBR 5/90) и способны к сбраживанию таких сложных углеводов, как крахмал, инулин и некоторые другие. Вероятно, успешное заселение ими пищеварительного тракта телят, получавших пробиотик, привело к более интенсивной ферментации углеводов корма и, как следствие, – к более высокому содержанию глюкозы в сыворотке.

По содержанию в сыворотке крови железа, фосфора и кальция существенных различий выявлено не было, отмечена тенденция к повышению содержания в крови опытных животных кальция и фосфора, но все показатели укладываются в рамки физиологической нормы.

Таблица 4. Биохимические показатели сыворотки крови телят (M+m, n=10)

Показатели	1 группа (контроль)	2 группа
Общий белок, г/л	62,9±2,4	60,3±1,9
Альбумин, г/л	38,6±1,2	38,3±0,9
Глобулины, г/л	24,3±1,2	22,0±1,1
Глюкоза, моль/л	2,5±0,1	3,2±0,3*
Мочевина, моль/л	3,2±0,2	5,0±0,4*
Кальций, моль/л	1,3±0,1	1,6±0,2
Железо, мкмоль/л	64,8±4,0	69,8±3,4
Фосфор, моль/л	3,5±0,2	4,3±0,2

В совокупности, все выявленные изменения физиологического состояния телят, получавших микробную добавку пробиотических лактобацилл, привели к их более интенсивному росту (табл. 5). Следует отметить, что превышение среднесуточного прироста живой массы у телят опытной группы по отношению к контрольной группе сохранилось и после прекращения дачи препарата, что было зафиксировано при контрольном взвешивании

через месяц после завершения выпойки пробиотика. Экономический эффект от использования препарата, рассчитанный с учётом затрат на производство пробиотика и реализационной стоимости 1 кг живой массы молодняка, установленной в хозяйстве – составил 139 руб на одного телёнка.

Таблица 5. Показатели роста телят (M+m)

Показатели	1 группа (контроль)	2 гру
Живая масса в начале опыта, кг (n=20)	27,9±0,3	27,2±0,3
через 20 дней, кг	40,1±1,0	40,8±1,2
Среднесуточный прирост, кг	0,61	0,68
% к контролю	100	112
через 50 дней, кг (n=10)	51,0±1,6	53,4±2,6
Среднесуточный прирост, кг	0,462	0,524
% к контролю	100	113

Данные, полученные в ходе изучения эффективности действия лиофилизированной формы разрабатываемого пробиотика, подтвердили результаты, полученные ранее в серии научных и научно-хозяйственных опытов, проведенных в Калужской и Брянской областях. На большом поголовье телят-молочников установлено, что препарат оказывает значительное влияние на становление микрофлоры пищеварительного тракта, снижая количество потенциально опасных микроорганизмов и повышая количество представителей лактобацилл и бифидобактерий, оказывающих положительное влияние на физиологические процессы в макроорганизме, в частности, на уровень неспецифической резистентности у телят. В проведенном исследовании эти физиологические эффекты в совокупности обусловили повышение среднесуточных приростов живой массы телят за 50 дней наблюдения в опытной группе на 13%, по отношению к контрольной группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинов Н.И. Микрометод определения фагоцитарной активности клеток крови // В сб.: Р.В. Петров (Ред.) Фагоцитоз и иммунитет. – М.: Институт иммунологии. – 1983. – С. 31-32.
2. Емельяненко П.А. Сезонная динамика гуморальных факторов естественной резистентности сыворотки крови новорожденных телят // Доклады ВАСХНИЛ. – 1977. – № 10. – С. 32-34.
3. Кондрахин И.П. (ред.) Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
4. Лифанова Я.В., Крапивина Е.В., Петраков Е.С. Эффективность использования пробиотика тетралактобактерин при выращивании телят // В сб.: Современные проблемы развития животноводства сборник научных трудов. – Брянск: Брянская ГСХА. – 2012. – С. 150-157.
5. Лифанова Я.В., Петраков Е.С., Федоров Ю.Н., Крапивина Е.В. Влияние пробиотического препарата лактобацилл на иммунный статус телят, содержащихся в зоне повышенного загрязнения ¹³⁷Cs // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2013. – № 4. – С. 91-98.
6. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве. – М.: Колос, 1976. – 304 с.
7. Петраков Е.С., Петракова Н.С. Оптимальная дозировка препарата пробиотических лактобацилл для телят // Известия Оренбургского ГАУ. – 2013. – Т. 44. – № 6. – С. 116-119.
8. Саруханов В.Я., Исамов Н.Н., Мирзоев Э.Б., Кобялко В.О. Модификация метода определения бактерицидной активности крови сельскохозяйственных животных // Сельскохозяйственная биология. – 2007. – № 2. – С. 119-122.
9. Conway P.L. Microbial ecology of the human large intestine // In: Gibson G., Macfarlane G. (Eds). Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. – Boca Raton: CRC Press, 1995. – P. 1-18.
10. Guarner F., Schaafsma G.J. Probiotics // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – Vol. 39. – P. 237-238.
11. Gorbach S.L. Probiotics and gastrointestinal health // Am. J. Gastroent. – 2000. – Vol. 95. – Suppl. 1. – P. 2-4.

12. McNaught C.E., MacFie J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence // *Nutr. Res.* – 2001. – Vol. 21. – P. 343-353.
13. Saxelin M., Elo S., Salminen S., Vapaatalo H. Dose response colonization of faeces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG // *Microb. Ecol. Health Dis.* – 1991. – Vol. 4. – P. 209-214.
14. Sepp E., Mikelsaar M., Salminen S. Effect of administration of *Lactobacillus casei* strain GG on the gastrointestinal microbiota of newborns // *Microb. Ecol. Health Dis.* – 1993. – Vol. 6. – P. 309-314.

REFERENCES

1. Blinov N.I. [The micromethod of determining the phagocytic activity of blood cells]. In: *Fagotsitoz i immunitet (red.)* (Phagocytosis and immunity, R.V. Petrov, ed.). Moscow: Institut of Immunity Publ., 1983, P. 31-32.
2. Conway P.L. Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson G., Macfarlane G. (Eds). *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*. Boca Raton: CRC Press, 1995, P. 1-18.
3. Emel'yanenko P.A. [Seasonal dynamics of humoral factors of natural resistance of blood serum of newborn calves]. *Doklady Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk - Reports of Russian Agricultural Sciences*. 1977, 10: 32-34.
4. Guarner F., Schaafsma G.J. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 39: 237-238.
5. Gorbach S.L. Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroent.* 2000, 95(1Suppl.): S2-4.
6. Kondrakhin I.P. (Ed.). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika v veterinarii: spravochnik* (Clinical and laboratory diagnostics in veterinary medicine: reference book). Moscow: KolosC, 2004, 520 p
7. Lifanova Ya.V., Krapivina E.V., Petrakov E.S. [The effectiveness of the use of the probiotic "tetralactobacterin" in growing calves]. In: *Sovremennye problemy razvitiya zhivotnovodstva sbornik nauchnykh trudov*. Bryansk: Bryansk GAU, 2012, P. 150-157.
8. Lifanova Ya.V., Petrakov E.S., Fedorov Yu.N., Krapivina E.V. [The effect of the probiotic preparation of lactobacilli on the immune status of calves kept in the zone of increased contamination of ¹³⁷Cs]. *Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2013, 4: 91-98.
9. McNaught C.E., MacFie J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutr. Res.* 2001, 21: 343-353.
10. Ovsyannikov A.I. *Osnovy opytnogo dela v zhivotnovodstve* (Basics of experimental work in animal husbandry). Moscow: Kolos Publ., 1976, 304 p.
11. Petrakov E.S., Petrakova N.S. [The optimal dosage of probiotic lactobacilli for calves]. *Izvestiya Orenburgskogo GAU - Proceedings of Orenburg State University*. 2013, 44(6): 116-119.
12. Sarukhanov V.Ya., Isamov N.N., Mirzoev E.B., Kobyalko V.O. [Modification of the method for determining the bactericidal activity of blood in farm animals]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2007, 2: 119-122.
13. Saxelin M., Elo S., Salminen S., Vapaatalo H. Dose response colonization of faeces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1991, 4: 209-214.
14. Sepp E., Mikelsaar M., Salminen S. Effect of administration of *Lactobacillus casei* strain GG on the gastrointestinal microbiota of newborns. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1993, 6: 309-314.

**Effect of probiotic on the basis of four strains of lactobacilli
on nonspecific resistance and productivity of milk calves**

Petrakov E.S., Ovcharova A.N., Sofronova O.V., Andreeva I.N.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Borovsk Kaluga oblast,
Russian Federation*

ABSTRACT. The aim was the study of efficiency of lyophilized form of probiotic being developed on the basis of four strains of lactobacilli (TLB). The experiment was carried out from the 1st to 20th day on two groups of calves, 10 bulls and 10 heifers each, the calves of control groups fed the basic diet (BD) and calves of test group fed BD + 1 g of a dry preparation of TLB with titre of viable cells 5×10^{10} CFU/g during 5 days in a week. Probiotic supplement to the diet influenced the formation of the microbiocenosis in digestive tract, which resulted in a significant increase in the number of lactobacilli ($P < 0.05$) and a decrease in the amount of *Escherichia coli*. In animals of the test group, the indices of nonspecific resistance (phagocytic and bactericidal activity of the blood serum, lysozyme content) were higher than in the control ($P < 0.05$). In calves that received TLB supplement, the urea content was higher than in control animals ($P < 0.05$), which indicates an increased metabolism of nitrogenous compounds. The higher glucose level in blood serum in these calves ($P < 0.05$), in comparison with control group, was probably due to a more intensive fermentation of carbohydrate feeds due to the colonization of the digestive tract by lactobacilli, which are part of TLB. The revealed physiological effects determined the increase in the mean daily live weight gain of calves in the test group over 50 days of observations by 13%, in comparison with the control group.

Keywords: milk calves, probiotics, lactobacilli, tetralactobacterin, resistance

Problemy biologii produktivnykh zhitovnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 2: 94-100

Поступило в редакцию: 26.04.2018

Получено после доработки: 29.05.2018

Петраков Евгений Сергеевич, к.б.н., зав. лаб., тел.+7 (961)125 -71- 47;
petrakov30@gmail.com;

Овчарова Анастасия Никитовна, к.б.н., с.н.с. тел. +7(964)146- 68- 62 ;

Софронова Ольга Владимировна, к.т.н., н.с. тел. +7(965)704-19- 62;

Андреева Ирина Николаевна, м.н.с., асп., тел. +7(985)343- 30