

УДК 619:616.84:619:615.3

**ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ
ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ПРОБИОТИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛАКТО-,
БИФИДОБАКТЕРИЙ И БАЦИЛЛ**

**М.А. Каврус¹, И.М. Лойко¹, А.Г. Щепеткова¹, Л.В. Романова²,
О.Н. Кузьмина², Ю.В. Гайдукевич²**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

² – Институт микробиологии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 26.06.2013 г.)

Аннотация. Проведены исследования по изучению лечебно-профилактической эффективности комплексного применения пробиотических препара-

ратов на основе спорообразующих, бифидо- и молочнокислых бактерий в условиях модельных опытов и производственных. Определены оптимальные профилактические и лечебные дозы комплекса пробиотиков и кратность их применения.

Показано, что совместное использование пробиотических препаратов – ДКМ, Бацинил-К, Билавет оказывает выраженный лечебный эффект при коллибактериозе у лабораторных животных, обеспечивает их 100% сохранность и на 50% сокращает период болезни. В производственных условиях вынашивание указанных препаратов телятам с первых часов жизни способствовало формированию нормального баланса микрофлоры кишечника, восстановлению его колонизационной резистентности, а следовательно и иммунного статуса всего организма у телят раннего постнатального периода.

Summary. Studies on the effectiveness of treatment and prevention of complex application of probiotics on the basis of sporeforming, bifidobacteria and lactic acid bacteria in model experiments and production have been conducted. The optimal preventive and therapeutic doses of probiotics and complex multiplicity of their application were identified.

It is shown that the combined use of probiotics – DCM, Batsinil-K, Bilavet has a pronounced therapeutic effect in kollibakterioze on laboratory animals, provide them with 100% recovery and 50% shortens the period of illness. In a production environment desoldering these drugs in the first hours of calves' life contributed to the formation of the normal balance of microflora of the colon, restoring its colonization resistance, and hence, the immune status of the organism in the warmth of the early postnatal period.

Введение. Современная интенсивная индустрия животноводства, птицеводства и рыбоводства основывается на использовании в качестве обязательных компонентов комбикормов различных биологически активных стимуляторов обмена веществ, пищеварения, иммунитета животных. Для повышения перевариваемости и усвояемости кормов, стимуляции роста и развития животных, повышения неспецифического иммунитета применяются ферментные, пробиотические, пребиотические и комбинированные ферментно-пробиотические препараты, а также комплексные пробиотические препараты [1, 2]. Пробиотики положительно влияют на организм хозяина, способствуют восстановлению пищеварения, биологического статуса, иммунного ответа, повышают эффективность вакцинаций. Их применение существенно уменьшает расходы на лечение заболеваний у животных, повышает продуктивность последних и улучшает качество продукции [3, 5, 6].

Позитивные эффекты пробиотических микроорганизмов, прежде всего молочнокислых бактерий и бифидобактерий, связаны с их способностью поддерживать и восстанавливать нормальный баланс кишечной микрофлоры с их стимулирующим действием на иммунную систему и способностью синтезировать витамины, ферменты и др. ре-

гуляторные факторы. Благоприятный эффект пробиотиков проявляется также в повышении устойчивости организма к воздействию потенциально вредных микроорганизмов и токсичных соединений [4, 5, 6].

Цель работы – оценить лечебно-профилактическую эффективность комплекса пробиотических препаратов на основе спорообразующих, бифидо- и молочнокислых бактерий у лабораторных животных и в производственных условиях.

Материал и методы исследования. Модельный опыт был проведен на 36 беспородных белых крысах массой 120-130 г в возрасте 1,5 месяцев, которые были разделены на 5 групп – контрольную и четыре опытные. Животных всех групп содержали на виварном рационе (рацион включал комбикорм, овощи, белый хлеб, творог). Для изучения лечебно-профилактической эффективности пробиотических препаратов на основе лакто-, бифидобактерий и бацилл лабораторных животных всех групп орально заражали выделенными из кишечника телят, больных колибактериозом, энтеропатогенными штаммами *E. coli*. На основе данной культуры готовили суспензию для выпойки животным с титром бактерий $\sim 1,5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Заражение продолжали до появления клинических признаков колибактериоза: угнетение, вялость, отсутствие аппетита, взъерошенность шерсти, диарея и т.д. После появления клинических симптомов колибактериоза животным опытных групп выпаивали комплекс пробиотических препаратов – ДКМ, Бацинил-К, Билавет в соотношении 2:1:1 соответственно, второй опытной группе – 1:2:1, третьей – 1:1:2 и четвертой 1:1:1 орально кратностью введения один раз в сутки, дополнительно лабораторным животным опытных групп применяли пробиотический препарат «Энатин» аэрозольно 1 раз в сутки до исчезновения клинических признаков болезни. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида (также в свободном доступе через поилки). Опыт продолжался в течение 14 дней.

Результатом эффективности применяемых пробиотических препаратов служили следующие показатели: поведение, состояние шерстного покрова, потребление корма, длительность течения заболевания, количество выздоровевших животных, лечебная эффективность.

Исследования лечебно-профилактической эффективности комплекса пробиотиков в производственных условиях проводили в ООО «Черлена» Мостовского района Гродненской области на телятах черно-пестрой породы в возрасте до 30 дней. В хозяйстве было отобрано 20 животных и сформировано по принципу пар-аналогов 2 группы по 10 голов в каждой. Одна группа была контрольной, вторая – опытной. Животные контрольной группы содержались в условиях технологии,

принятой в хозяйстве, телятам же опытной группы дополнительно за­давали пробиотические препараты - ДКМ, Бацинил-К, Билавет в соот­ношении 1:2:1 соответственно. Комплексный препарат телята получа­ли перорально, в дозе 3 мл на голову в сутки, ежедневно, с молозивом или молоком с 1-2-суточного возраста по 30-й день после рождения.

Для определения влияния комплекса пробиотических препаратов на количественный и качественный состав микрофлоры кишечника телят проводили отбор фекалий до начала опытов и через 30 дней. Пробы фекалий отбирали непосредственно из прямой кишки во время дефекации. Для забора материала использовали стерильную, предва­рительно взвешенную емкость. Пробы исследовались в течение 2-х часов с момента забора. После взвешивания пробу разводили в 10 раз. Из основного разведения делали ряд последующих.

Посев производили на соответствующие агаризованные пита­тельные среды в чашках Петри в объеме 0.1 мл суспензии фекалий раз­личных разведений, в зависимости от предполагаемого количества тех или иных микроорганизмов. При выделении бифидобактерий исполь­зовали бифидобактериум агар, лактобактерий – лактобакаагар, стафило­кокков – солевой МПА. Для выделения грамотрицательных неспоро­образующих факультативно-анаэробных бактерий использовали среду Эндо. С целью выделения микроскопических грибов использовали среду Сабуро. Учет результатов посева осуществлялся через 24, 48 ча­сов. Рост на бифидосреде и на среде Сабуро наблюдали через 2-4 су­ток. Инкубацию анаэробной микрофлоры проводили в микроанаэро­стате при +37°C в течение 48 часов. Инкубация посевов микромицет проводилась в течение 72 и более часов при +27°C.

Оценку результатов высева проб на плотные питательные среды проводили после появления учитываемых колониеобразующих единиц (КОЕ) по всей площади поверхности чашки Петри. Подсчет КОЕ и их дифференциацию проводили с учетом особенностей культуральных свойств микроорганизмов (форма, цвет колонии и т. п.).

Количество бактерий в 1 г фекалий определяли по числу колоний, выросших на соответствующей питательной среде с пересчетом на ко­личество посеянного материала и степень его разведения.

Ориентировочную идентификацию бифидо- и лактобактерий проводили микроскопическим методом (окраска мазка по Граму), ко­торый позволяет оценить морфологию клеток. В мазках бифидобакте­рии имели вид прямых или разветвленных грамположительных палочек X, Y и V-образной формы с булавовидными утолщениями на кон­цах. Молочнокислые бактерии представляли собой прямые грамполо­жительные палочки с закругленными концами, расположенные в поле

зрения единично или цепочками. Идентификацию кишечной палочки проводили по морфолого-культуральным свойствам и биохимическим свойствам. Родовую принадлежность микромицет определяли с учетом их морфологических и культуральных особенностей. В ходе опытов определяли количество кишечных палочек, бифидобактерий, лактобацилл, спорообразующих аэробных бацилл, стафилококков, микроскопических грибов в толстом кишечнике.

Во время проведения исследований фиксировали все случаи заболевания телят желудочно-кишечными болезнями. Заболеваемость животных определяли путем статистического сопоставления числа всех животных в каждой группе с числом заболевших. Профилактическую эффективность применяемого комплексного препарата на основе продуктов пчеловодства оценивали по приросту живой массы, заболеваемости телят диспепсией, длительности клинического проявления болезни, сохранности животных.

При исследовании микроскопических препаратов бактерий использовали прибор БИОСКАН (Республика Беларусь) на базе микроскопа ЛОМО МИКМЕД-2 и цветную цифровую видеокамеру НІР – 7830 с прикладной компьютерной программой БИОСКАН 1.5 и программным приложением MS OFFICE. Морфологию нативных клеток изучали методом фазово-контрастной микроскопии на микроскопе МБИ-16 «ЛОМО» (Россия) при инструментальном увеличении 1x1000 [7, 8, 9].

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты модельного опыта на лабораторных животных показали, что появление клинических симптомов колибактериоза у животных всех групп отмечалось на 2-3 сутки после заражения энтеропатогенным штаммом *E. coli*, причем в контрольной группе из 9 крыс данные симптомы отмечались у 7 животных, в первой опытной группе – из 9 – у 8 крыс, во второй опытной группе – из 9 – у 7 крыс, в третьей опытной группе – из 9 – у 6 крыс и в четвертой опытной группе – из 9 – у 8 крыс. Заболевание протекало остро и характеризовалось угнетением, вялостью животных, отсутствием аппетита, взъерошенностью шерсти, появлением диареи. После появления клинических симптомов колибактериоза животным опытных групп начали выпаивать (в свободном доступе через поилки) пробиотические препараты. Уже на 2-е (в первой опытной группе) и на 3-и (во второй, третьей и четвертой опытных группах) сутки от начала выпаивания отмечена тенденция к улучшению состояния животных: крысы стали подвижны, появился аппетит, исчезли признаки диареи. На 4-5 сутки заболевшие животные всех опытных групп полностью выздоровели: появилось активное движение, хоро-

ший аппетит, отсутствовала взерошенность шерсти и диарея. Падежа животных в опытных группах отмечено не было. Показано, что соотношение препаратов ДКМ, Бацинил-К, Билавет 1:2:1 соответственно было наиболее оптимальным.

У крыс контрольной группы болезнь протекала значительно тяжелее: угнетенное состояние, плохой аппетит, диарея отмечались в течение 5-6 дней, а затем постепенно животные стали приходить в норму и на 9-10 сутки после появления симптомов колибактериоза клинические признаки болезни исчезли. Однако при этом из 7 заболевших животных трое погибли (42,8%).

Таким образом, применение комплекса пробиотических препаратов позволило сократить продолжительность болезни у лабораторных животных на 3-4 суток и обеспечить их 100% сохранность.

При изучении эффективности использования пробиотиков в производственных условиях основное внимание уделялось формированию микробиоценоза желудочно-кишечного тракта молодых животных.

Полученные результаты показали, что у телят 2-3-дневного возраста (как контрольной, так и опытной групп) в содержимом кишечника преобладали бактерии группы кишечной палочки (табл.). Микроорганизмов этой группы насчитывалось в среднем $2,8-3,2 \times 10^4$ КОЕ/г. На фоне преобладания в посевах бактерий группы кишечной палочки титр молочнокислых и бифидобактерий у телят контрольной и опытной групп в начале опыта составил соответственно $1,0-1,8 \times 10^6$ – $1,6-1,9 \times 10^6$ КОЕ/г.

Как видно из таблицы, в микрофлоре кишечника телят 2-3-дневного возраста присутствовали стафилококки ($1,3-1,7 \times 10^5$ КОЕ/г) и некоторое количество дрожжеподобных грибов р.*Candida* ($0,6-1,0 \times 10^4$ КОЕ/г). По-видимому, преобладание микроорганизмов группы кишечной палочки в кишечном биоценозе новорожденных телят связано со снижением колострального иммунитета, нарушением условий кормления и содержания матерей, частой вакцинацией, антибиотикотерапией.

Бактериологический анализ фекалий телят показал, что комплексное использование пробиотиков телятам раннего постнатального периода способствовало значительному улучшению микробиологической структуры их кишечного биоценоза. К концу эксперимента в кишечнике телят опытной группы отмечалась активизация лактобацилл. Уровень лактофлоры в кишечнике животных опытной группы превысил контроль в 1,56 раза. Подобным образом в кишечнике телят опытной группы изменялось и содержание бифидобактерий. Данный показатель превысил контрольный уровень на 30-й день опыта в 1,35 раза.

Таблица – Результаты бактериологических исследований фекалий телят

Микроорганизмы	Группа	Количество микроорганизмов в 1 г фекалий, КОЕ	
		до применения пробиотиков	после применения пробиотиков
<i>Bifidum</i>	Контрольная	$1,4 \pm 0,27 \times 10^8$	$1,7 \pm 0,27 \times 10^9$
	Опытная	$1,6 \pm 0,42 \times 10^7$	$2,3 \pm 0,27 \times 10^9$
<i>Lactobacillus</i>	Контрольная	$1,8 \pm 0,95 \times 10^6$	$0,9 \pm 0,32 \times 10^6$
	Опытная	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	$1,4 \pm 0,40 \times 10^8$
<i>E.coli</i>	Контрольная	$2,8 \pm 0,82 \times 10^4$	$0,7 \pm 0,16 \times 10^6$
	Опытная	$3,2 \pm 0,63 \times 10^4$	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Контрольная	$1,3 \pm 0,25 \times 10^6$	$1,0 \pm 0,27 \times 10^7$
	Опытная	$1,7 \pm 0,46 \times 10^8$	$0,6 \pm 0,14 \times 10^5$
<i>Candida</i>	Контрольная	$1,0 \pm 0,34 \times 10^4$	$0,4 \pm 0,17 \times 10^4$
	Опытная	$0,6 \pm 0,28 \times 10^4$	-

Примечание: «-» отсутствие КОЕ на питательной среде

Параллельно с активизацией нормофлоры в кишечнике животных опытной группы регистрировалось снижение уровня условно-патогенных микроорганизмов.

Введение в рацион телят комплекса пробиотиков способствовало уменьшению активности стафилококков (табл.). Их уровень в кишечнике животных опытной группы снизился в сравнении с контрольным в 1,67 раза. Фоновое значение микроорганизмов группы кишечной палочки в кишечнике телят контрольной группы составило к концу эксперимента $0,7 \times 10^4$ КОЕ/г. Использование телятам пробиотических препаратов привело к выведению бактерий группы кишечной палочки из кишечника. Микроорганизмы данной группы в кишечнике телят опытной группы к концу опыта не выделялись.

Подобное действие комплекса препаратов наблюдалось также по отношению к содержанию в кишечнике телят опытной группы дрожжеподобных грибов р. *Candida*. В кишечнике телят контрольной группы данные микроорганизмы присутствовали в количестве $0,4 \times 10^4$ КОЕ/г, что, по-видимому, вызвано нарушением микробной экологии кишечника животных и созданием благоприятных условий для их размножения в прямой кишке. Тогда как из кишечника телят опытной группы микроскопические грибы к концу эксперимента не выделялись.

Заключение. Проведенные исследования показали, что использование комплекса пробиотических препаратов – ДКМ, Бацинил-К, «Билавет» оказывает выраженный лечебный эффект при колибактериозе у лабораторных животных, а в производственных условиях способствует восстановлению колонизационной резистентности кишечника, а следовательно и иммунного статуса всего организма у телят раннего постнатального периода. Отмечено отсутствие ингибирования

резидентной микрофлоры (активизация развития молочнокислых и бифидобактерий в 1,56 раза) и выраженный антагонизм по отношению к энтеробактериям, псевдомонадам и клебсиелам (их уровень в кишке животных опытной группы снизился в сравнении с контрольным в 1,67 раза.)

Определены оптимальные профилактические (1-3 мл) и лечебные (3-7мл) дозы комплекса пробиотиков с кратностью применения 1-2 раза в день соответственно. Установлено, что наиболее эффективным является одновременное применение исследуемых препаратов (ДКМ, Бацинил-К, Билавет в соотношении 1:2:1 соответственно), а не последовательное.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алямкин, Ю. Пробиотики вместо антибиотиков это реально / Ю. Алямкин // Птицеводство. - 2005. - № 2. - С. 17-18.
2. Зернов, В.С. Биологически активные вещества и их значение для животноводства // В.С.Зернов/ Тез. докл. науч. конф. «Теория и практика использования биологически активных веществ в животноводстве» — Киров, 1998. -С.3-4.
3. Зернов, В.С. Рост телят-молочников при скармливании пробиотика БЦЛв смеси с фито-экстрактом лезен сафлоровидной // В.С. Зернов, Г.Ф. Нурбаков, Н.В. Бурнышева/ Аграрная Наука Евро-Северо-Востока, 2004. — № 5. — С.92-95.
4. Каширская, Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры // Н.Ю. Каширская / Русский медицинский журнал. – 2000. – № 12. – С. 27-32.
5. Неустров, М.П., Татарнинова, С.С. Применение пробиотика «Сахабактисубтил» стельным коровам / М.П. Неустров, С.С. Татарнинова //Зоотехния. – 2006. – № 12. – С. 21–23.
6. Осипова, И.Г., Сорокулова, И.Б., Васильева, Е.А., Буданова, Е.В. Доклинические испытания новых споровых пробиотиков / И.Г. Осипова, И.Б. Сорокулова, Е.А. Васильева, Е.В. Буданова // Вестн. РАМН. – 2005. –№ 12. – С. 36–40.
7. Осипова, И.Г., Михайлова, Н.А., Сорокулова, И.Б., Васильева, Е.А., Гайдеров, А.А. Споровые пробиотики / И.Г. Осипова, Н.А. Михайлова, И.Б. Сорокулова, Е.А. Васильева, А.А. Гайдеров // Ж. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 113–119.
8. Тараканов, Б.В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организма животных // Б.В. Тараканов / Ветеринария. – 2000. -№ 1. – С. 47 – 54.
9. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев. – Мн.: Ураджай, 1988. – 168 с.