

Agroecosystem. Advances in Engineering Research. 2018. Vol/151/. pp. 182-186.

13. Tyulebaev S.D., Kadysheva M.D., Litovchenko V.G. [et al]. The use single-nucleotide polymorphism in creating a crossline of meat Simmentals. Conference on innovations in Agricultural and Rural development. IOP Conf. Series: Earth and

Environmental Science. 2019. No 341.

14. Sedykh T.A., Gizatullin R.S., Kosilov V.I. Adapting australian hereford cattle to the conditions of the Southern Urals. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2018. Vol. 9. No 3. pp. 885-898.

УДК 579.864:636.4-053

DOI: 10.34655/bgsha.2020.60.3.011

А.Л. Сепп, А.В. Яшин, В.Д. Раднатаров

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *ENTEROCOCCUS FAECIUM* L 3 ПРИ ГАСТРОЭНТЕРИТЕ У ПОРОСЯТ

Ключевые слова: микробиота, пищеварительные ферменты, желудочно-кишечный тракт, гастроэнтерит, пробиотики.

Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что пероральное применение пробиотического штамма E. faecium L3 на фоне дисбиоза кишечника способствует более быстрому восстановлению ферментов, участвующих в конечном гидролизе белков, жиров и углеводов, а также отмечается выраженная динамика восстановления микробиоценоза кишечника у животных. В результате проведенных исследований установили, что у больных гастроэнтеритом поросят через 14 дней от начала применения Enterococcus faecim L3 в кишечной микробиоте отмечалось снижение содержания Escherichia coli и повышалось содержание лактобацилл и энтерококков (по сравнению с контрольной группой животных). При этом отмечено повышение активности ряда кишечных пищеварительных ферментов (α -амилаза, мальтаза, аминопептидаза N) и снижение активности щелочной фосфатазы. Таким образом, применение пробиотического препарата на основе штамма Enterococcus faecim L3 поросятам в период отъема восстанавливает состав кишечной микробиоты и повышает активность ключевых кишечных пищеварительных ферментов, что ускоряет адаптацию организма животных к новому типу кормления, положительно влияет на обменные процессы, стимулирует рост животных.

A. Sepp, A. Yashin, V. Radnatarov

THE USE OF A PROBIOTIC STRAIN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* L 3 FOR GASTROENTERITIS IN PIGLETS

Keywords: microbiota, digestive enzymes, gastrointestinal tract, gastroenteritis, probiotics.

The results, which have been obtained, indicate that the oral administration of the probiotic strain E. faecium L3 against intestinal dysbiosis promotes the rapid restoration of enzymes involved in the hydrolysis of proteins, fats and carbohydrates, as well as a pronounced dynamics in the restoration of intestinal microbiocinosis in animals. As a result of the studies, it was found that in the piglets with gastroenteritis 14 days after the start of using Enterococcus faecim L3, a decrease in the content of Escherichia coli was noted in the intestinal microbiota, and the content of lactobacilli and enterococci increased (compared with the control group of animals). At the same time, an increase in the activity of a number of intestinal digestive enzymes (α -amylase, maltase, aminopeptidase N) and a decrease in the activity of alkaline phosphatase were noted. Thus, the

use of a probiotic preparation based on the Enterococcus faecium L3 strain for piglets during weaning, restores the composition of the intestinal microbiota and increases the activity of key intestinal digestive enzymes, which accelerates the adaptation of the animal organism to a new type of feeding, positively affects metabolic processes, stimulates the growth of animals.

Сепп Анастасия Леонидовна, аспирант кафедры внутренних болезней животных им. Синева А.В.; e-mail: anastasiya.sepp@bk.ru

Anastasiya L. Sepp, graduate student, Chair of Internal Diseases of Animals named after A. V. Sinev; anastasiya.sepp@bk.ru

Яшин Анатолий Викторович, доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой внутренних болезней животных им. Синева А.В.; e-mail: anatoliy-yashin@yandex.ru

Anatoliy V. Yashin, Doctor of Veterinary Science, Professor, Chair of Internal Diseases of Animals named after A. V. Sinev; e-mail: anatoliy-yashin@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine; St. Petersburg, Russia

Раднатаров Владимир Дулмажапович, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, клинической диагностики, акушерства и биотехнологии

Vladimir D. Radnatarov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Chair of Therapy, Clinical Diagnostics, Obstetrics and Biotechnology

ФГБОУ ВО «Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В.Р. Филлипова», Улан-Удэ, Россия

Buryat State Academy of Agriculture named after V.R. Philippov, Ulan-Ude, Russia

Введение. Среди заболеваний молодняка свиней в период отъема значительное место занимают желудочно-кишечные патологии. В этот период пищеварительная система поросят еще не адаптирована к новому типу питания, что способствует изменению микробиоценоза кишечника, приводящему к функциональным расстройствам его деятельности [4]. При энтеральной патологии происходят выраженные нарушения механизмов, обеспечивающих полостное, мембранное пищеварение, а также всасывание.

Широкое применение антибактериальных и других этиотропных препаратов нарушает сложившиеся взаимоотношения между макро- и микроорганизмами [2]. В последнее время отмечено значительное повышение устойчивости многих патогенных микроорганизмов к этиотропным препаратам [5]. Научные исследования многих авторов свидетельствуют о возрастающем интересе к использованию пробиотических штаммов микроорганизмов в животноводстве для повышения скорости роста и сохранности поросят [7; 3].

Одним из таких штаммов является *Enterococcus faecium* L-3. Имеется дли-

тельный опыт применения пробиотического штамма *E. faecium* L-3 в лечебной практике при различных патологических состояниях, обусловленных дисбиозами у человека и животных [1]. Однако, изучение его свойств и влияния на состояние микробиоценоза кишечника и мембранное пищеварение у поросят при гастроэнтерите до сих пор не являлось предметом систематических исследований.

Таким образом, рассматриваемая проблема является важной, а настоящая работа, посвященная исследованию различных ее аспектов у поросят, - актуальной.

Целью данного исследования было изучение влияния пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 на состав микробиоты и активность пищеварительных ферментов кишечника при гастроэнтерите у поросят в период отъема.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились на животных в два этапа.

1. На первом этапе разработана экспериментальная модель антибиотико-ассоциированного дисбактериоза кишечника на лабораторных животных;

2. Второй этап исследований заклю-

чался в разработке новых подходов к коррекции дисбактериоза кишечника как на лабораторных животных, так и на поросятах, больных гастроэнтеритом в период отъема.

Экспериментальный антибиотико-ассоциированный дисбактериоз кишечника воспроизводили на 30 крысах («Вистар», самцы, масса тела 200–250 г).

Содержание, кормление и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН. Для проведения опытов путем аналогов было сформировано три группы животных. В опытной группе О1 (n=12) крысам в начале опыта в течение трех дней подряд перорально вводили ампициллин и метронидазол (в дозах соответственно 15 и 10 мг на животное), предварительно растворив в 0,5 мл дистиллированной воды. Затем в течение четырнадцати дней аналогичным способом и в таком же объеме вводили штамм *E. faecium* L-3 в дозе 8 lgКОЕ/мл. В контрольной группе К1 (n=11) животным в начале опыта аналогичным способом вводили antimикробные препараты, а затем дистиллированную воду. Крысам контрольной группы К0 (n=7) в течение 17 дней вводили только дистиллированную воду. На протяжении всех экспериментов проводили ежедневный мониторинг за клиническим состоянием животных, физической активностью, массой тела животных, аппетитом (количество съеденного корма), характером стула. Через 14 дней применения пробиотического энтерококка от животных из всех групп отбирали пробы фекалий для исследования микробиоты, а после декапитации отбирали пробы слизистой оболочки и химуса из различных отделов тонкой кишки (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная), а также из толстой кишки для определения в них активности кишечных мембранных пищеварительных ферментов: щелочной фосфатазы (НФ 3.1.3.1), аминопептидазы-N (НФ 3.4.11.2), Q-амилазы (НФ 3.2.1.1) и мальтазы (НФ 3.2.1.20).

Производственные экспериментальные исследования проводили в свиноводческом хозяйстве Новгородской области на 20 поросятах породы крупная белая хландрас в возрасте 27 дней, в период отъема с клиническими признаками гастроэнтерита. С этой целью были сформированы 2 группы животных из пометов разных свиноматок (контрольная и опытная, n=10 в каждой). В опытной группе поросятам в течение 14 дней перорально вводили пробиотический штамм *Enterococcus faecium* L-3 в дозе 9 lgКОЕ/мл на животное. В контрольной группе этот препарат не вводился. Ежедневно проводили клинические исследования животных, фиксировались все случаи возникновения патологий желудочно-кишечного тракта. Через 7 и 14 дней от начала применения пробиотического энтерококка отбирали пробы фекалий для бактериологических исследований и определения активности пищеварительных ферментов (щелочной фосфатазы, аминопептидазы N, Q-амилазы и мальтазы), осуществляющих мембранное пищеварение.

Микробиоценоз кишечника у животных исследовали бактериологическим методом и постановкой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), используя тест-систему («Колонифлор», ООО «Альфалаб», Россия).

Активность ферментов определяли в гомогенатах слизистой оболочки и химуса тонкой и толстой кишки, а также фекалий. Исследование гомогенатов слизистой оболочки кишки позволяет судить об общем запасе ферментов в энтероцитах, а исследование химусной фракции и фекалий отражает динамическое равновесие между скоростью поступления ферментов в составе слущенного эпителия в полость кишечника и скоростью их деградации под действием ферментов полостного пищеварения.

Для каждого фермента рассчитывались значения как удельной (мкмоль/мин. на 1 г ткани), так и интегральной активности с учетом массы слизистой оболочки или химуса (мкмоль/мин. на участок тонкой кишки или мкмоль/мин. на всю кишку).

Математический анализ и статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft Office 2010 с использованием критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. После перорального введения крысам линии Вистар ампицилли-

на и метронидазола отмечались следующие симптомы: полифекалия, изменение консистенции стула, ухудшение аппетита, снижение веса. Введение животным пробиотических бактерий *E. faecium* L3 (группа O1) ускорило устранение симптомов диспепсии по сравнению с контролем K1.

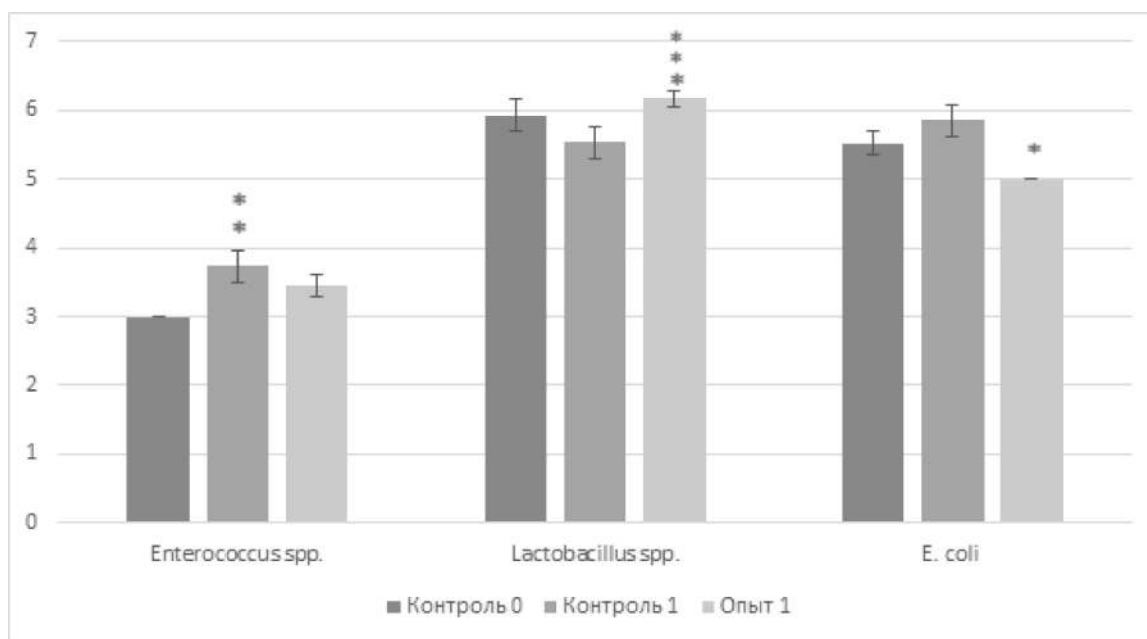


Рисунок 1. Содержание отдельных представителей микробиоты через 14 дней применения *E. faecium* L3. *- $P < 0,0027$ по отношению к контролю (K1), **- $P < 0,01$ по отношению к контролю (K1), ***- $P < 0,05$ по отношению к контролю (K1)

Как видно на рисунке 1, через 14 дней с момента введения антибактериальных препаратов в фекалиях контрольной группы животных (K1) достоверно ($P < 0,01$) повышено количество бактерий родов *Enterococcus spp.* и наблюдается тенденция к повышению *Escherichia coli*. В то же время отмечается лишь тенденция к снижению количества лактобацилл. На фоне применения пробиотического штамма (группа O1) достоверно повышается содержание *Lactobacillus spp.* и снижается количество *Escherichia coli*.

Повышение удельной активности щелочной фосфатазы (рис. 2) в контрольной группе (K1), по сравнению с группой K0, наблюдается через 14 дней. Применение пробиотического энтерококка (O1) заметно снижает ферментативную активность в двенадцатиперстной кишке и в проксимальном отделе тощей (на 15,0%). На

28,0% наблюдается снижение интегральной активности фермента в опытной группе (O1) по сравнению с контрольной группой (K1).

Аминопептидазы-N, которая осуществляет конечные этапы гидролиза пищевых белков, наиболее достоверно изменялась в слизистой оболочке кишечника.

Активность мальтазы в химусе, которая, по-видимому, характеризует суммарную активность слущенного эпителия и микрофлоры, будучи относительно низкой в двенадцатиперстной, и верхнем отделе тощей кишки существенно возрастает в нижних отделах кишечника (в дистальном отделе тощей кишки и в подвздошной) примерно на 67,0-86,0%. Повышение уровня мальтазной активности в нижних отделах кишечника, вероятно, связано с увеличением активности микрофлоры в этих отделах кишечника.

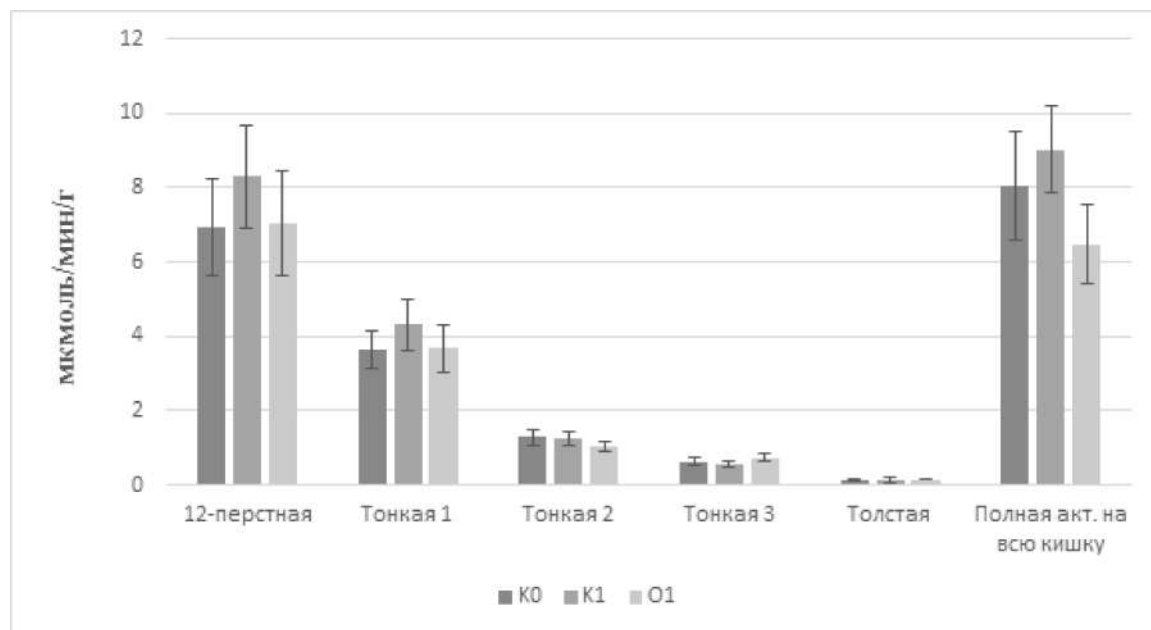


Рисунок 2. Удельная активность ЩФ в слизистой оболочке кишечника через 14 дней применения *E. faecium L3*

α -Амилаза в слизистой оболочке тонкой кишки во всех группах оставалась примерно на одном уровне. В химусе толстого отдела кишечника через 14 дней применения пробиотического энтерококка наблюдалось повышение активности фермента в опытной группе (O1) на 16,4% по сравнению с группой здоровых животных (K0) и на 5,8% по сравнению с контрольной группой (K1).

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что пероральное применение пробиотического штамма *E. faecium L3* на фоне антибиотико-ассоциированного дисбактериоза кишечника способствует более быстрому восстановлению ферментов, участвующих в конечном гидролизе белков, жиров и углеводов, а также отмечается выраженная динамика восстановления микробиоциноза кишечника у лабораторных животных.

При клиническом исследовании поросят, больных гастроэнтеритом, нами установлено, что температура тела была в пределах 38,3-39,7°C. Наблюдали диарею с примесью слизи. Средний вес животных составлял 5,86±0,05 кг. Применение пробиотического *Enterococcus faecium L3* (опытная группа) способствовало снижению на третий день клинического прояв-

ления гастроэнтерита у животных и полное выздоровление на пятый день. В то же время, у поросят контрольной группы на пятый день отмечалось лишь снижение симптомов заболевания желудочно-кишечного тракта. В конце эксперимента поросята, получавшие в течение 14 дней пробиотические бактерии *Enterococcus faecium L3*, имели более высокий (на 5,0%) прирост массы тела по сравнению с контролем ($P<0,01$).

В конце экспериментального периода (через 14 дней) при бактериологическом исследовании микробиоты у животных опытной группы (по сравнению с контрольной) отмечены тенденции к увеличению содержания *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* и тенденция к снижению содержания *Escherichia coli*, что можно наблюдать на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3, наиболее значимые изменения активности пищеварительных ферментов наблюдались на седьмой день применения пробиотического препарата. Активности α -амилазы, мальтазы и аминопептидазы -N после применения препарата в течение 7 дней повышались на 24,4% ($P<0,01$), 36,1% и 52,6% ($P<0,0027$), соответственно, по сравнению с контролем. Можно предположить, что повышение активности α -ами-



Рисунок 3. Содержание некоторых представителей резидентной микрофлоры через 14 дней применения *E. faecium* L3

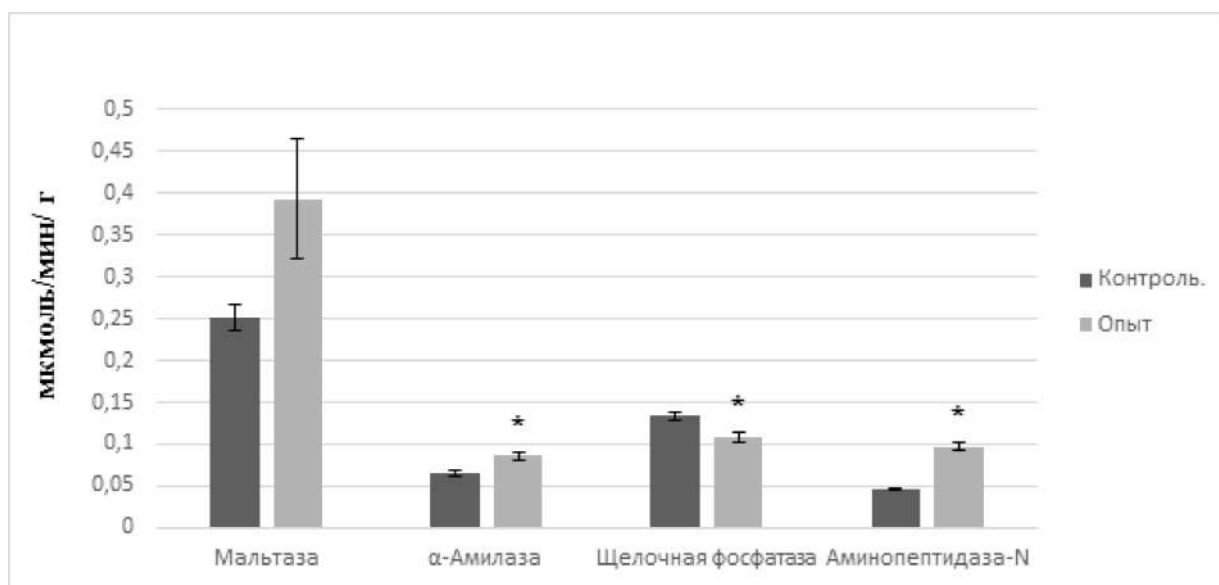


Рисунок 4. Активность ферментов через 7 дней применения *E. faecium* L3 * $-P < 0,01$ по отношению к контролю (без пробиотика)

лазы и мальтазы связано с существенным вкладом в расщепление углеводов в кишечнике поросят микрофлоры, продукты метаболизма которой оказывают влияние на активность мембранных карбогидраз энтероцитов. Это предположение косвенно подтверждается данными бактериологического исследования. При этом активность щелочной фосфатазы снизилась по сравнению с контролем на 18,7% ($P < 0,01$). Учитывая, что щелочная фосфатаза помимо участия в пищеварении выполняет также важную защитную функцию (детоксикация бактериального токсина -

липополисахарида) [8], снижение ее активности после применения пробиотика на основе *E. faecium* L3 может быть следствием уменьшения в этих условиях, содержания условно патогенных бактерий в кишечнике.

Через 14 дней применения пробиотического препарата была повышена на 29,8% ($P < 0,01$) лишь активность α -амилазы.

Заключение. Таким образом, проведенные нами исследования на экспериментальной модели антибиотико-ассоциированного дисбактериоза кишечника у крыс показали, что применение пробио-

тического штамма *Enterococcus faecium* L-3 в течение 14 дней приводит к нормализации микробиоценоза кишечника, а именно: достоверно повышается содержание *Lactobacillus* spp. и снижается количество *Escherichia coli*, способствует восстановлению активности ферментов кишечника: щелочной фосфатазы, аминоклотидазы-N и мальтазы, включение в коррекционную схему лечения поросят, больных гастроэнтеритом, пробиотического штамма *E. faecium* L-3 (9 IgКОЕ/мл) положительно влияет на клиническое состояние животных, стимулирует обмен веществ, увеличивает массу тела животных.

Библиографический список

1. Влияние пробиотических штаммов эшерихий и энтерококков на активность кишечных пищеварительных ферментов при коррекции экспериментального дисбиоза у крыс / Л. В. Громова, Е. И. Ермоленко, Ю. В. Дмитриева, А. С. Алексеева, А. Л. Сепп, М. П. Котылева, А. Н. Суворов // Медицинский алфавит. – 2018. – Т. 2. – № 20 (357). – С. 29-32.
2. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками / Е.И. Ермоленко, В.Н. Донец, Ю.В. Дмитриева, Ю.Ю. Ильясов, М.А. Суворова, Л.В. Громова // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2009. – Вып. № 1. – 160 с.
3. Елизаров И.В. Спорообразующий пробиотик Проваген в свиноводстве / И.В. Елизаров // Ветеринария. – 2009. – №9. – С.17-18.
4. Зубарев А.Е., Анфилатова Д.В. Показатели крови поросят при даче пробиотического препарата на основе штамма *Lactobacillus paracasei*. Иппология и ветеринария. – 2017. – №1 (23). – С.49-53.
5. Пробиотики и синбиотики на их основе – альтернатива кормовым антибиотикам / Л.А. Неминущая, Г.И. Воробьева, Б.В. Кравчик, Т.А. Скотникова, В.И. Еремец, Н.К. Еремец, С.А. Гринь, А.Я. Самуйленко // Ветеринария и кормление. – 2014. – №6. – С. 20-21.
6. Яшин А.В., Дмитриенко В.Г. Исследование иммунокорректирующего влияния пробиотика Ветом-1.1 на организм поросят-отъемышей // Ветеринарная практика. – 2004. – №26 (3). – 21 с.
7. Ermolenko E., Gromova L., Borshchov Yu., Voeikova A., Karaseva A., Ermolenko K., Gruzdkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with disbiosis // Bioscience of Microbiota, Food and Health. – 2013. – Vol. – 32, № 2. – 42 p.
8. Lallus J.P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects // Nutr. Rev. – 2014. – Vol. 72, № 2. – 84 p.
1. Gromova L.V., Yermolenko Ye.I., Dmitriyeva Yu.V., Alekseyeva A.S., Sepp A.L., Kotyleva M.P., Suvorov A.N. Effect of probiotic strains of *Escherichia* and *Enterococci* on activities of intestinal digestive enzymes at correction of experimental dysbiosis in rats. *Meditinskiy alfavit*. 2018. T. 2. No 20 (357). pp.29-32 [in Russian]
2. Yermolenko Ye.I., Donets V.N., Dmitriyeva Yu.V., Ilyasov Yu.Yu., Suvorova M.A., Gromova L.V. Influence of probiotic enterococci on the functional characteristics of the intestines of rats with antibiotic-induced dysbiosis. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 11. Meditsina*. 2009. Issue No 1. pp.160 [in Russian]
3. Yelizarov I.V. Spore-forming probiotic Provacen in pig breeding. *Veterinariya*. 2009. No 9. pp.17-18 [in Russian]
4. Zubarev A.Ye., Anfilatova D.V. Blood parameters of piglets when giving probiotic preparation on the basis of the *Lactobacillus paracasei* strain. *Ippologiya i veterinariya*. 2017. No 1 (23). pp.49-53 [in Russian]
5. Neminushchaya L. A., Vorobyeva G. I., Kravchik B. V., Skotnikova T. A., V. I. Yeremets, Yeremets N. K., Grin S. A., Samuylenko A. Ya. Probiotics and synbiotics based on them - an alternative to feed antibiotics. *Veterinariya i kormleniye*. 2014. No 6. pp.20-21 p. [in Russian]
6. Yashin A. V., Dmitriyenko V. G. Study of the immunocorrecting effect of the probiotic Vetom-1.1 on the organism of weaned pigs. *Veterinarnaya praktika*. 2004. No26 (3). 21 p. [in Russian]
7. Ermolenko E., Gromova L., Borshchov Yu., Voeikova A., Karaseva A., Ermolenko K., Gruzdkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with disbiosis. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2013. Vol. 32. No 2. 42 p.
8. Lallus J.P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr. Rev.* 2014. Vol. 72. No 2. 84 p.