Ветеринария

УДК 636.2.053:612.326.3

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ НОРМОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА У ТЕЛЯТ В ПЕРВЫЕ НЕДЕЛИ ЖИЗНИ

Вербицкий А.А., Велева Е.Р.
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Микробиом кишечника представляет собой сложную экосистему, которая может саморегулироваться. Но для того, чтобы эта система работала и приносила положительный результат макроорганизму, необходимо, чтобы в первые недели жизни животного, когда идет формирование нормобиоценоза, были созданы условия и разработаны мероприятия для улучшения обеспечения этого процесса. ***Ключевые слова:*** *микробиота кишечника, газовая хроматография – масс-спектрометрия, нормобиоценоз, дисбиотическое состояние, телята.*

FEATURES OF THE FORMATION OF INTESTINAL NORMOBIOCENOSIS IN CALVES IN THE FIRST WEEKS OF LIFE

Verbitsky A.A., Veleva E.R.
Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Intestinal microbiome is a complex ecosystem that can be self-regulate. But for successfully working of this system and bringing a positive result to the macroorganism, it is necessary that in the first weeks of the animal's life, when the formation of normobiocenosis is underway, conditions are created and measures are developed to improve the support of this process. ***Keywords:*** *intestinal microbiota, gas chromatography–mass spectrometry, normobiocenosis, dysbiotic state, calves.*

Введение. Серьезное внимание ветеринарных специалистов направлено на вопросы формирования кишечного нормобиоценоза животных и его структурно-функциональных изменений. Актуальность этих вопросов, без сомнений, определяется рядом негативных последствий из-за часто возникающих дисбиотических нарушений, что приводит к проблемам развития высокопродуктивного животноводства.

В первые минуты постнатального периода жизни организм животного попадает в среду, обильно обсемененную микроорганизмами различных видов, в результате чего происходит заселение ими макроорганизма. Пищеварительная система животного является связующим звеном, которое участвует в контакте организма с внешней средой, поэтому наиболее колонизированным является желудочно-кишечный тракт, в котором численность и видовое разнообразие микроорганизмов максимальны. Дальнейшие отношения между микроорганизмами и макроорганизмом могут складываться в нескольких направлениях, и это может быть симбиоз, комменсализм, паразитизм. Формирование колонизационной резистентности по отношению к патогенным микроорганизмам играет важную роль в дальнейшем росте и развитии растущего организма животного.

Очевидным и неоспоримым является тот факт, что микробиом кишечника играет ведущую роль в здоровом развитии организма животного, выполняя ряд жизненно важных функций (рисунок 1), которые можно систематизировать в четыре основные группы: защитную, пищеварительную, метаболическую и иммуномодулирующую.

Рисунок 1 - Значение нормальной микрофлоры кишечника для организма животного

Защитная функция обусловливается обеспечением колонизационной резистентности кишечника, что подразумевает создание благоприятных условий для стабильного развития нормальной микробиоты и избежания заселения патогенными микроорганизмами. Способность микробиоты кишечника продуцировать антагонистически активные вещества, такие как бактериоцины и другие бактериостатические метаболиты, позволяет составлять определенную конкуренцию условно-патогенным и патогенным микроорганизмам.

Важной функцией, несомненно, является участие микроорганизмов в пищеварении, которое осуществляется за счет синтеза ферментов. Так называемое симбионтное пищеварение обеспечивает регуляцию функций кишечника, утилизацию питательных субстратов, гидролиз белков, расщепление углеводов. Следует отметить, что некоторые вещества, поступающие с кормом, могут метаболизироваться исключительно кишечной микробиотой, например, неперевариваемые углеводы.

Метаболическая функция микробиоты кишечника заключается в участии во всех видах обмена веществ. Микроорганизмы, входящие в состав нормального микробиома кишечника, способны продуцировать различные биологически активные вещества. Это короткоцепочные жирные кислоты, прежде всего уксусная, пропионовая, масляная, участвующие в основном обмене веществ, регуляции pH кишечника, обладающие антимикробным действием, тем самым поддерживая микробное постоянство макроорганизма. Способность индигенной микрофлоры синтезировать витамины группы В (тиамин, рибофлавин, ниацин, пантенол, пиридоксин, фолиевую кислоту, цианокобаламин), витамин К, аминокислоты, а также участвовать в обмене микроэлементов, в детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов подчеркивает значимость так называемого сотрудничества микроорганизмов с организмом животного.

Иммуномодуляция – одна из важнейших функций микробиоты. Она активизирует синтез неспецифических факторов защиты как гуморальных (лизоцим, пропердин, комплемент), так и клеточных (фагоцитоз), стимулирует созревание лимфоидного аппарата, выработку IgA, продукцию цитокинов и интерферонов [1-5].

Состав микробиоты кишечника в первые недели жизни должен включать в себя примерно на 80-90% бактерии родов *Bifidobacterium, Lactobacillus*. Однако добиться этого сложно, так как существует много факторов, влияющих на формирование видового разнообразия кишечного микробиома. К основным из них можно отнести состав микрофлоры родовых путей, санитарно-гигиенические условия содержания, своевременную выпойку молозива [1-5].

Целью исследований явилось определение состава микробиома кишечника телят в первые недели жизни для уточнения данных по формированию нормобиоценоза кишечника и возможности возникновения его нарушений.

Материалы и методы исследований. Исследованиям подвергались телята в первые часы после рождения, далее – на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й дни. Этот период постнатального развития выбран на основании данных о том, что формирование нормобиоценоза кишечника заканчивается к 28-дневному возрасту.

Исследуемый биотоп – тонкий кишечник телят. Анализируемый материал – кровь, взятая методом «сухая капля». Под термином «сухая капля» подразумевается перенесенный на фильтровальную бумагу и затем высушенный образец крови. Этот метод очень удобен, так как прост в получении, не требует срочной дополнительной обработки, обеспечивает надежное хранение и удобную транспортировку проб.

Для проведения наших исследований был выбран количественный микробиологический анализ микробных маркеров методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС). Данный метод обладает рядом критериев, которые позволяют считать результаты максимально точными и достоверными, а именно: одновременное определение десятков маркеров микроорганизмов в одном анализе; определение разных групп микроорганизмов: бактерий, грибов, вирусов; время одного анализа не более трех часов; высокая чувствительность; определение микроорганизма до вида. Сущность метода заключается в извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из исследуемого образца, их разделения на хроматографе и анализа состава на масс-спектрометре. Микробиологический анализ микробных маркеров методом ГХ-МС основывается на идентификации микроорганизмов по составу синтезируемых ими жирных кислот, для которых характерна родо- и видоспецифичность [6, 7].

Результаты исследований. Исследования методом ГХ-МС микробных маркеров тонкого кишечника, в крови показали, что уже при рождении кишечник телят имеет достаточно высокую и разнообразную по видовому составу бактериальную нагрузку. Это позволяет сделать вывод о том, что изначально микробиом кишечника начинает формироваться в момент внутриутробного развития и зависит от состава микрофлоры беременной коровы (нормоценоз или дисбиотическое состояние), а также функционального состояния плаценты. Далее, попадая в условия внешней среды, происходит наслоение микроорганизмами, которые можно разделить на резидентные и транзиторные. Резидентные микроорганизмы составляют основу нормобиоценоза

кишечника и присутствуют в нем постоянно. Однако следует учитывать, что избыточное их количество может приводить к нежелательным последствиям. Транзиторные же микроорганизмы представлены условно-патогенными и патогенными микроорганизмами.

Была определена концентрация 58 микроорганизмов. Результаты приведены в таблице 1. Идентифицированы микроорганизмы родов *Actinomyces, Alcaligenes, Bifidobacterium, Clostridium, Eggerthella, Eubacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Nocardia, Propionibacterium, Pseudonocardia, Rhodococcus, Ruminococcus, Staphylococcus, Streptococcus*, которые являются резидентными представителями микробиома кишечника, и их присутствие допустимо.

Таблица 1 - Средние значения состава микробиома кишечника у телят в первые недели жизни

Микроорганизмы	Возраст телят				
	до 1 часа, кл/г×10^5	7-й день, кл/г×10^5	14-й день, кл/г×10^5	21-й день, кл/г×10^5	28-й день, кл/г×10^5
Actinomyces spp.	0	1,8	0	0	0
Actinomyces viscozus	236,2	502,6	291,4	271,2	243,8
Alcaligenes spp.	60,2	105,4	43,6	81	101,4
Bifidobacterium spp.	70	527	339	487	268,4
Clostridium coccoides	195,4	110,8	35,8	43,2	35,6
Clostridium perfringens	0	0	3	0	60,4
Clostridium propionicum	12,8	234,6	67,4	234,4	209,8
Clostridium ramozum	676,4	1311,4	442,2	541,6	379
Clostridium tetani	0	2274	45,8	1369	233,6
Corineform CDC-group XX	0	9,6	0	6	0
Eggerthella lenta	203,2	333	329	662,8	573,4
Eubacterium spp.	1824,6	2489,6	1521	2494	1733,6
Fuzobacterium/Haemophylus	0	0	0	0	1,4
Lactobacillus spp.	1212,2	1592,6	1123	899,6	724,2
Lactococcus spp.	525,8	1178,2	733,4	871,6	743,6
Nocardia asteroides	147,2	216,8	281,4	281,4	127,4
Prevotella spp.	0	0	0	0	0
Propionibacterium acnes	9,2	179	112,4	316,6	329,6
Propionibacterium freudenreichii	449,2	950	609,4	1585	1437,8
Propionibacterium jensenii	0	347	79,4	434	516,4
Pseudonocardia spp.	1,2	10,6	1,2	9,2	80,6
Rhodococcus spp.	152,4	112,4	79,8	123,2	80,6
Ruminococcus spp.	1046,2	2015,6	1384	1762	1022,2
Staphylococcus	837,6	1212,2	941,2	1101	967
Staphylococcus epidermidis	0	2,8	0	1,2	0
Streptococcus mutans (анаэробн.)	560,2	850,8	207,2	380,4	542,2
Streptococcus spp.	100,4	363,8	575,8	1076	1079,2
Streptomyces spp.	32,8	305,4	127	285,2	270,6
Bacillus cereus	0	0	0	0	0
Bacteroides fragilis	0	0	0	0	0
Bacteroides hypermegas	0	0	0	0	0
Campylobacter mucosalis	0	0	0	0	0
Clostridium difficile	627,8	283,4	472,4	0	0
Clostridium hystoliticum	0	0	0	0	0
Enterococcus spp.	0	0	0	0	0
Flavobacterium spp.	0	0	0	0	0
Helicobacter pylori	0	0	0	0	0
Kingella spp.	0	0	0	0	0
Acinetobacter spp.	0	0	0	0	0
Peptostreptococcus anaerobius 17642	0	0	0	0	0
Peptostreptococcus anaerobius 18623	0	80,2	0	0	0
Porphyromanas spp.	0	0	0	0	0

Продолжение таблицы 1

Микроорганизмы	Возраст телят				
	до 1 часа, кл/г×10^5	7-й день, кл/г×10^5	14-й день, кл/г×10^5	21-й день, кл/г×10^5	28-й день, кл/г×10^5
Prevotella ruminicola	0	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0
сем. Enterobacteriaceae (E. coli и пр.)	0	0	0	0	0
Candida spp.	2674,8	2886,6	1503	1387	1117,2
Aspergillus spp.	29	28,2	1	8,6	5
Micromycetes spp. (кампестерол)	553,6	391,6	109,4	121,4	105,2
Micromycetes spp. (ситостерол)	534,2	352,8	104,6	12,6	31,2
Herpes simplex	1294,2	1381	218,2	463,4	335,2
Вирус Эпштейна-Барр	46,8	53,8	57,2	164	103,6
Цитомегаловирус	0	0	0	0	0
Bacillus megaterium	0	0	0	0	0
Chlamidia trachomatis	0	0	0	0	0
Mycobacterium spp.	0	0	0	0	0
Propionibacterium spp.	0	0	0	0	0
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0	0	0
Streptomyces farmamarensis	0	0	0	0	0

Однако, исходя из данных таблицы, отмечается высокая концентрация бактерий следующих родов. *Clostridium* - известно, что в случае избыточного роста клостридии вырабатывают сильные бактериальные экзотоксины, также ряд протеолитических ферментов, что приводит к локальному повреждению тканей. *Ruminococcus* расщепляют целлюлозу, в большом количестве заселяют рубец жвачных и толстую кишку, синтезируют небелковую часть гемоглобина - гем (комплексное соединение порфиринов с двухвалентным железом), который требуется организму для производства элементов крови. *Staphylococcus* вызывают множество заболеваний, среди которых гнойные инфекции, интоксикации, инфекции мочевых путей и маститы. *Streptococcus* могут являться причиной довольно большого количества опасных заболеваний: от кормовых отравлений до гнойных процессов практически в любой точке организма.

Из транзиторных микроорганизмов, наличие которых не предусматривается в нормобиоценозе кишечника, тем самым указывает на наличие патологического процесса, отмечается присутствие *Clostridium difficile*. Данный вид обладает способностью продуцировать экзотоксины, повреждающие кишечную стенку. В большом количестве в состав микробиома кишечника входят микроскопические грибы рода *Candida*. Это условный патоген, живущий на слизистых оболочках, выделяет токсины, которые ослабляют иммунную систему. Также обращает на себя внимание значительное количество вируса герпеса, который может активно действовать в составе микробно-вирусных ассоциаций.

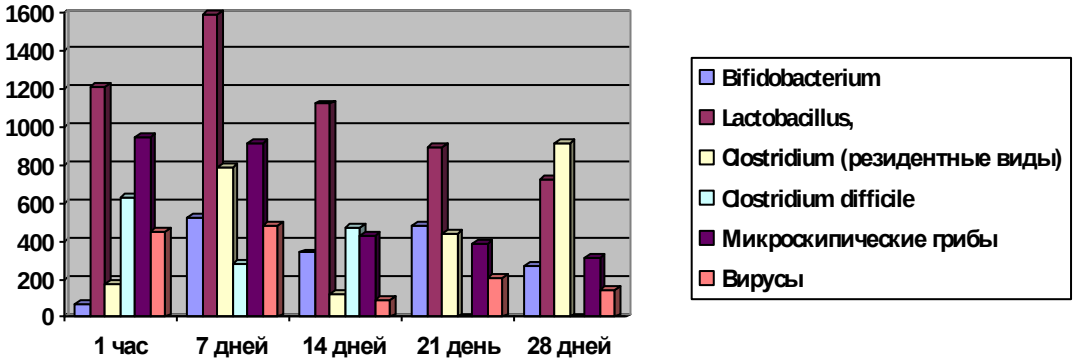

Рисунок 2 - Количественное изменение состава микробиоты кишечника в первые 4 недели постнатального периода

Анализируя изменение количественного состава микробиоты кишечника в течение первого месяца постнатального периода (рисунок 2), вырисовывается следующая картина. Количество бактерий рода *Bifidobacterium* увеличивается к концу первой недели и практически остает-

ся неизменным на 14-й и 21-й дни, а на 28-й день отмечается значительное снижение данных бактерий. Достаточно высокая концентрация микробных клеток отмечается у бактерий рода *Lactobacillus*: максимальная – на 7-й день, в последующем наблюдается снижение, но в целом остается высокой. Резидентные виды микроорганизмов рода *Clostridium* довольно в большой концентрации присутствуют в микробиоме кишечника телят, причем наблюдается их значительное увеличение в течение периода проведения исследований. А вот представитель транзиторной микробиоты - *Clostridium difficile* снижает свое количество до нуля. Уменьшается также количество микроскопических грибов и вирусов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что к месячному возрасту у телят формируется микробиом кишечника, который включает в себя в большей степени резидентные микроорганизмы. Однако очевидным является факт, что самостоятельно добиться преимущественной концентрации бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* довольно сложно, что приводит к развитию нежелательно большого количества условно-патогенных, патогенных микроорганизмов, а также микроскопических грибов и вирусов.

Заключение. Формирование нормобиоценоза кишечника – сложный многоступенчатый процесс, который в условиях промышленного животноводства затруднен без тщательного контроля и проведения профилактических мероприятий. Важным является факт, что уже в период внутриутробного развития идет закладка «микробного фундамента», с которого и начнется формирование такой функционально значимой экосистемы, как микробиом кишечника. Эволюционно сложившаяся способность резидентной микробиоты к саморегулированию зависит от множества внешних факторов и не всегда может самостоятельно справляться с этой задачей. Поэтому необходима разработка и применение новых биологически активных препаратов природного и микробного происхождения, обладающих высокими терапевтическими и иммуностимулирующими свойствами, не снижающими качества продуктов животноводства. К таким препаратам нового поколения можно отнести метабиотики, полученные на основе метаболитов бактерий. Их применение с первых дней жизни животного будет способствовать увеличению бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, что будет положительно сказываться на состоянии нормобиоценоза кишечника.

Литература. *1. Арбузова, А. А. Этиологические аспекты возникновения желудочно-кишечных заболеваний телят раннего постнатального периода / А. А. Арбузова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – Казань, 2010. – Т. 200. – С. 11–18. 2. Урсова, Н. И. Формирование кишечного микробиоценоза: состояние проблемы / Н. И. Урсова // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–69. 3. Формирование кишечного микробиоценоза у телят с синдромом гипотрофии в молочный период / А. Г. Шахов [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – Т. 49, № 2. – С. 105–111. 4. Кишечная микробиота: современные представления / Е. М. Булатова [и др.] // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2009. – Т. 87, № 3. – С. 104–109. 5. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / Р. Беркли [и др.] ; под ред. Дж. Хоулта [и др.]. – 9-е изд. – Москва : Мир, 1997. – 2 т. 6. Осипов, Г. А. Хромато – масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах / Г. А. Осипов // Химический анализ в медицинской диагностике. – Москва : Наука, 2010. – С. 293–368. 7. Осипов Г. А. Клиническое значение исследование микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культуральным, биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами / Г. А. Осипов, А. И. Парфенов, Н. В. Верховцева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2004. – № 5. – С. 27.*

Поступила в редакцию 15.01.2020 г.

УДК 636.934.57:611.34

ВЫЯВЛЕНИЕ ЗНАЧИМЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ КИШЕЧНИКА У АМЕРИКАНСКИХ НОРОК РАЗНЫХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ОКРАСОВ МЕТОДОМ ДИСКРИМИНАНТНОГО АНАЛИЗА

Волосевич Д.П.
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье рассмотрены особенности макро- и микроморфологии кишечника американской норки с учетом ее цветового типа: регал, сканблэк, сканбраун, сапфир, паломино или пастель. Среди полученных данных методом дискриминантного анализа выявлены определяющие морфометрические признаки кишечника, которыми явились показатели толщины слизистого слоя тощей, подвздошной и прямой кишок, мышечного слоя ободочной кишки, и показатели абсолютной длины тонкого кишечника. Наиболее отличающимся генотипом по совокупности признаков оказался сапфир. ***Ключевые слова:*** *американская норка, кишечник, слизистая оболочка, мышечная оболочка, длина кишечника, дискриминантный анализ.*