



## ВЛИЯНИЕ ЛАКТУЛОЗЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО КАНАЛА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

**Т.В. Олива, Г.И. Горшков**

Белгородская государственная  
сельскохозяйственная академия  
им. В.Я.Горина, Россия, 308503,  
Белгородская область, Белгородский  
район, пос. Майский, ул. Вавилова, 1

E-mail: olivatv@mail.ru

Приводятся результаты исследования по формированию микробиоценоза в зобу, слепых и прямой кишке трех- и семисуточных цыплят-бройлеров, получавших пребиотик с лактулозой. Пребиотик стимулирует заселение просвета кишечника полезной микрофлорой уже в первую неделю жизни цыплят. В то же время обнаружены отсутствие адгезии лакто- и бифидобактерий на стенки переднего отдела пищеварительного тракта и слепых отростков кишок и их слабая адгезия в прямой кишке цыплят семисуточного возраста.

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, микрофлора кишечника, адгезия, пребиотик, лактулоза.

### Введение

Известно, что у нормально развивающихся эмбрионов птиц желудочно-кишечный тракт свободен от микроорганизмов. Его заселение микрофлорой начинается с момента наклева цыпленком скорлупы яйца, в которой он развивался, и общения с внешней средой. В естественных условиях в этом участвуют микрофлора ротовой полости при научении наседкой цыпленка распознавать и принимать корм, а также находящиеся в окружающей среде фекальные микроорганизмы здоровой птицы, с которой он соприкасается. В условиях инкубатора первичный контакт происходит со стерильной средой, если тщательно проведена дезинфекция яиц и оборудования, или с искусственно сформировавшимся непрогнозируемым микробным составом, загрязняющим оборудование и помещения, нередко контаминированные патогенными штаммами. По данным В.М. Субботина [1, 2], в первые 5 суток наиболее активно заселяют кишечник эшерихии и энтерококки (высеваются соответственно из 100 и 90% проб). Лакто- и бифидобактерии к концу первых суток обнаруживаются в кишечнике соответственно у 40 и 20% цыплят. К 10-м суткам они есть у всех особей и в последующие сроки продолжают увеличиваться в своей численности. Стабилизация микробиоценоза устанавливается к 15–20 суткам, что зависит не столько от численности привнесенных полезных видов бактерий сколько от их колонизационных свойств [2]. По нашим данным [3] и данным ряда авторов [4, 5], к 34–42-суточному возрасту завершается направленное формирование бактериоценоза кишечника здоровой птицы. Сформированная полезная микрофлора обычно вытесняет патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, предотвращает возникновение и развитие эндогенной инфекции. Хорошо выражены свойства адгезии к кишечному эпителию у грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli*, *Klebsiella*, энтерококки, но среди них есть и патогенные штаммы. Поэтому на перспективу стоит задача создания в кишечнике цыпленка уже с первых дней жизни таких условий, которые были бы благоприятны для развития нормальной полезной микрофлоры с наивысшими колонизационными способностями и сдерживали бы рост и развитие нежелательных видов. Такое направление исследований получило название конкурентного включения (КИ). Так, в кишечник односуточного цыпленка вводили содержимое клоаки здоровой птицы, и у него формировался нормальный микробиоценоз, способствующий развитию иммунитета по типу взрослого организма. Было установлено, что продукты КИ должны применяться не позднее первых 24 часов после выведения из яйца. Однако эти исследования единичны и не позволяют существенным образом и надежно корректировать заселение микроорганизмами пищеварительного тракта цыплят-бройлеров в первые и последующие дни их жизни, поэтому дальнейший поиск способов и средств создания условий для КИ представляет научный интерес.

Цель настоящей работы – изучить бактериальную адгезию к кишечному эпителию и формирование состава микробиоценоза в разных отделах пищеварительного канала при выпавании цыплятам в первую неделю жизни пребиотика лактулозы с тем, чтобы определить возможность его использования для стимуляции развития собственной полезной кишечной микрофлоры и вытеснения из микробиоценоза нежелательных видов.



### Материалы и методы

Исследование проведено на базе лаборатории птицеводства ФГБОУ ВПО БелГСХА им. В.Я. Горина. Из цыплят-бройлеров кросса Hubbard ISA были сформированы две группы (контрольная и опытная), по 10 голов в каждой. Опытной группе, находящейся на том же рационе, что и контрольная, выпаивали пребиотический препарат Лактусан российской фирмы «Фелицата», представляющий собой концентрат лактулозы (дисахарид – галактоза+фруктоза). Концентрация водного раствора лактулозы (1 мл/л) была подобрана с учетом нормального функционирования кишечника и с целью стимуляции роста находящейся в пищеварительном канале цыплят полезной микрофлоры.

На третьи и седьмые сутки от начала опыта из каждой группы отбирали по 3 цыпленка для патолого-морфологических и микробиологических исследований. В асептических условиях отбирали зоб, участок толстого кишечника с двумя слепыми отростками и прямой кишкой. Их содержимое (точную навеску) тщательно растирали с изотоническим раствором натрия хлорида и согласно методическим рекомендациям [6] готовили последующие десятикратные разведения ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ). Для выделения и культивирования бактерий производили посевы исследуемого материала на питательные среды: для энтеробактерий – на висмут-сульфитный агар, агар Эндо, среды Плоскирева, Симмонса и Левина; для энтерококков – на желточно-солевой агар; для гемолизирующих форм – на 5%-ный кровяной агар; для дрожжеподобных грибов – на агар Сабуро. По *E. coli* проводили скрининг гемолитических, лактозонегативных и со сниженной ферментативной активностью форм. Для культивирования лакто- и бифидобактерий использовали питательную среду ( $pH=6.8$ ) следующего состава: 30.0 г панкреатического гидролизата казеина, 5.0 г экстракта пекарских дрожжей, 7.5 г глюкозы, 2.5 г лактозы, 0.5 г цистеина, 2.5 г натрия хлорида, 0.5 г магния сульфата семиводного, 0.5 г кислоты аскорбиновой, 0.3 г натрия ацетата трехводного, 0.75 г агара. Число колоний определяли после трехсуточной инкубации посевов при температуре 37°C. Из колоний готовили мазки и окрашивали их по Граму. Также готовили мазки-отпечатки слизистой оболочки зоба, слепого отростка и прямой кишки. После высушивания их окрашивали по Граму и исследовали под микроскопом при иммерсионной системе [7]. Микроскопия окрашенных мазков-отпечатков позволяла выявить не только наличие, но и ориентировочно оценить адгезию молочнокислых бактерий на эпителиальных клетках слизистой оболочки. Условно выделяли три степени обсемененности слизистых оболочек: слабую – до 20 микробных тел; среднюю – от 20 до 40 микробных тел; высокую – более 40 микробных тел в поле зрения. При статистическом анализе достоверность разницы между сравниваемыми величинами числа выросших колоний определяли по аргументу Стьюдента ( $t_d$ ). Разница считалась достоверной при  $p \leq 0.05$  с последующей градацией до  $p \leq 0.001$ . Полученный результат КОЕ переводили в десятичный логарифм числа.

### Результаты исследований

На вскрытии грудной и брюшной полостей цыплят-бройлеров каких-либо визуальных патологических изменений не обнаружено.

При микроскопическом анализе бактериального пейзажа пищеварительного канала трехсуточных цыплят-бройлеров установлено, что колонизация толстого кишечника произошла тремя основными группами микроорганизмов – лактобактериями, бифидобактериями и бактериями группы кишечной палочки (табл. 1).

Таблица 1  
Микробный пейзаж пищеварительного канала трехсуточных цыплят, Ig КОЕ/г

Группы бактерий	Контрольная группа	Опытная группа
1	2	3
в зобе		
Лактобактерии	1.20±0.08	1.21±0.05
Бифидобактерии	не выявлены	не выявлены
Бактерии группы кишечной палочки	не выявлены	не выявлены
Стафилококки	0.48±0.01	0.48±0.01
Энтерококки	не выявлены	не выявлены
Дрожжеподобные грибы	не выявлены	не выявлены
Патогенные энтеробактерии	не выявлены	не выявлены
в слепых кишках		
Лактобактерии	4.12±0.36	3.91±0.73
Бифидобактерии	6.57±0.45	6.73±0.25



Окончание табл. 1

1	2	3
Бактерии группы кишечной палочки	не выявлены	не выявлены
Энтерококки	не выявлены	не выявлены
Дрожжеподобные грибы	не выявлены	не выявлены
Патогенные энтеробактерии	не выявлены	не выявлены
в прямой кишке		
Лактобактерии	5.55±0.05	5.60±0.81
Бифидобактерии	5.42±0.08	5.48±0.18
Бактерии группы кишечной палочки, в т.ч.	6.82±0.22	5.67±0.11**
гемолитически активные формы	4.01±0.01	не выявлены
лактозонегативные формы	5.64±0.34	не выявлены
Стафилококки	единичные	единичные
Энтерококки	3.85±0.10	2.78±0.01**
Дрожжеподобные грибы	2.90±0.03	2.01±0.01***
Патогенные энтеробактерии	не выявлены	не выявлены

Примечание: степень достоверности разницы с контролем: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Просветная микрофлора зоба трехсуточных цыплят была представлена незначительным количеством лактобактерий и стафилококков. Выпаивание в опытной группе птицы пребиотика с лактулозой увеличивало в прямой кишке интенсивность колонизации лактобактериями на 13%, бифидобактериями – на 11.5% по сравнению с контрольной группой, не получавшей Лактусан. В то же время наибольшее количество бактерий группы кишечной палочки было в содержимом кишечника контрольной группы птиц. Дополнительным высевом культуры из  $10^{-5}$  разведения на кровяном агаре и среде Эндо содержимого прямой кишки цыплят контрольной группы выявлены гемолитические и лактозонегативные формы, которые по численности составили 6.6% от общего количества бактерий группы кишечной палочки. В содержимом кишечника у цыплят, получавших лактулозу, гемолитические и лактозонегативные бактерии не выявлены. На третьи сутки развития птиц наблюдалось также достаточно интенсивное заселение отделов прямой кишки энтерококками (в основном *Str. faecalis* и *Str. faecium*). В содержимом кишечника контрольной группы гемолитических форм оказалось больше, чем в 10 раз по сравнению с содержимым кишки опытных птиц. В прямой кишке обеих групп были обнаружены дрожжеподобные грибы рода *Candida*. При этом установлено, что лактулоза снижает интенсивность заселения кишки дрожжеподобными грибами в 8 раз. Численность стафилококков в содержимом кишки обеих групп по сравнению со всеми изученными представителями кишечного биоценоза была наименьшей и практически приближалась к нулю.

После выпаивания в течение недели птице Лактусана происходила дальнейшая стабилизация и тенденция увеличения численности симбиотической микрофлоры (табл. 2).

Таблица 2

#### Микробный пейзаж пищеварительного канала семисуточных цыплят, lg КОЕ/г

Группы бактерий	Контрольная группа	Опытная группа
1	2	3
в зобе		
Лактобактерии	5.08 ± 0.03	5.48 ± 0.04
Бифидобактерии	2.00 ± 0.07	2.00 ± 0.05
Бактерии группы кишечной палочки	5.78 ± 0.09	4.53 ± 0.15
Стафилококки	единичные	единичные
Энтерококки	2.00 ± 0.03	2.60 ± 0.02
Дрожжеподобные грибы	не выявлены	не выявлены
Патогенные энтеробактерии	не выявлены	не выявлены
в слепых кишках		
Лактобактерии	7.08 ± 0.01	7.51 ± 0.04
Бифидобактерии	6.01 ± 0.08	6.76 ± 0.02
Бактерии группы кишечной палочки	4.84 ± 0.45	4.81 ± 0.07
Стафилококки	не выявлены	не выявлены
Энтерококки	3.06 ± 0.03	2.79 ± 0.08
Дрожжеподобные грибы	не выявлены	не выявлены
Патогенные энтеробактерии	не выявлены	не выявлены



Окончание табл. 2

1	2	3
в прямой кишке		
Лактобактерии	6.94 ±0.07	9.86 ±0.14***
Бифидобактерии	7.68±0.01	9.00±0.05**
Бактерии группы кишечной палочки, в т.ч.	7.76±1.04	7.73±1.05
гемолитически активные формы	5.18±0.07	не выявлены
лактозонегативные формы	6.12±0.06	не выявлены
Стафилококки	единичные	единичные
Энтерококки	3.88±0.53	3.68±0.03
Дрожжеподобные грибы	2.90±0,07	2.00±0.01***
Патогенные энтеробактерии	не выявлены	не выявлены

Примечание: степень достоверности разницы с контролем: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.01$ .

Патогенных бактерий в пищеварительном тракте и трех-, и семисуточных цыплят-бройлеров не обнаружено. У семисуточных цыплят из опытной группы отмечен рост популяции лактобактерий в содержимом зоба и слепых кишок в среднем в 2.5 раза и с нарастающей колонизацией в содержимом прямой кишки в 830 раз по сравнению контрольной птицы. Бифидобактерии появлялись в содержимом зоба, а в слепых и прямой кишках их количество возрастало в среднем в 5.5 и 20 раз соответственно. Заселенность появившихся в зобу стрептококков была в 4 раза больше у опытной птицы, хотя в слепых и прямой кишках в их отношении наблюдали обратную картину. Численность энтеробактерий в сумме варьировала, но их колонизационные способности возрастали к задним отделам кишечника птиц обеих групп. Обнаруженные в микробиоценозе прямой кишки цыплят контрольной группы гемолитические и лактозонегативные формы бактерий вытеснялись симбиотической микрофлорой и их численность составляла в среднем 2.6% от общего количества бактерий группы кишечной палочки. Так как обнаружение оппортунистических форм бактерий в содержимом пищеварительного тракта цыплят, не получавших пребиотик, является прогностически неблагоприятным, это служит показателем необходимости проведения в дальнейшем соответствующих профилактических мероприятий для укрепления здоровья растущих птиц. Пребиотик лактулоза известен как естественный фактор, который способствует увеличению в кишечнике численности пробиотических бактерий, нормализующих нарушенный кишечный микробиоценоз [8] и так же, как и пробиотики [9, 10], он может стать неотъемлемым компонентом рационального кормления животных. Особо следует подчеркнуть, что вводимые орально пробиотические добавки не способны длительно сохраняться без существенного изменения их количественного и качественного характера, потому что представители автохтонной микрофлоры присутствуют в организме в виде фиксированных к определенным рецепторам микроколоний, а фиксация бактерий к поверхности слизистой оболочки пищеварительного канала имеет видовую и анатомическую специфичность. Например, выделенные из кишки одних животных, лактобактерии не способны фиксироваться к эпителиальным клеткам кишечника других животных. То есть точные данные о том, в каком возрасте, в каком качественном и количественном составе происходит их адгезия, что препятствует или, наоборот, стимулирует этот процесс до настоящего времени отсутствуют. Поэтому перед нами стояла задача выявить наиболее успешные в этом плане индигенные микроорганизмы путем стимуляции их развития пребиотиком. При исследовании мазков-отпечатков слизистой оболочки зоба, слепых отростков и прямой кишки цыплят-бройлеров трехсуточного возраста молочнокислые бактерии не были обнаружены ни у контрольной, ни у опытной птицы. После выпаивания цыплятам лактулозы в течение 7 суток нами выявлена первоначальная слабая степень фиксации лактобактерий (около 20 микробных тел в поле зрения) и бифидобактерий (около 10 микробных тел) к слизистой оболочке толстого кишечника. На свойство эпителиальных клеток слизистых оболочек первично адсорбировать микрофлору к семисуточному возрасту с последующей активизацией этого процесса еще в течение 3 недель указывают также некоторые авторы [11]. По мнению Б.А. Шендерова [8], микроорганизмы в составе биопленки в десятки-сотни раз более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов по сравнению с тем, когда они находятся в свободно плавающем состоянии. Исходя из этого, мы предлагаем создание перспективных пробиотиков пролонгированного действия на основе выделения штаммов молочнокислых бактерий из слизистой оболочки кишечника. Этот вывод послужил основанием для нашей дальнейшей работы по созданию пробиотика, обладающего пролонгированным и направленным действием, с рабочим названием ЛАКТО-11 для эффективного выращивания цыплят-бройлеров.



### Заключение

Из представленных данных следует, что видовой и численный состав микроорганизмов, присутствующих в зобу, слепых и прямой кишках трех- и семисуточных цыплят, существенно различается. После выпаивания в этот период пребиотика с лактулозой численность лакто- и бифидобактерий уменьшалась, *E. coli* снижалась; не выявлялись гемолитические и лактозонегативные штаммы, присутствующие в кишечнике цыплят контрольной группы, количество грибов рода *Candida* уменьшалось. В то же время выпаивание раствора лактулозы способствовало первичной адгезии молочнокислых бактерий на слизистой оболочке прямой кишки птицы, что определяет возможности использования данного пребиотика для стимуляции развития собственной полезной кишечной микрофлоры, вытеснения из микробиоценоза нежелательных видов с первой недели жизни цыплят-бройлеров, а также создания на их основе пробиотика пролонгированного действия.

### Список литературы

1. Субботин В.В. Новый пробиотический препарат бифацидобактерин (лактобифидол) и его профилактическая эффективность при откорме бройлерных цыплят // Новые фармакологические средства в ветеринарии: Материалы 10-й Международной межвузовской научно-практической конференции. – СПб.: ГАВМ, 1998. – С. 31.
2. Субботин В.В. Кишечная микрофлора бройлерных цыплят в норме и при клинически выраженной диарее // Новые фармакологические средства в ветеринарии: Материалы 10-й Международной межвузовской научно-практической конференции. – СПб.: ГАВМ, 1998. – С. 212.
3. Олива Т.В. К вопросу микробной экологии кишечника бройлеров // Доклады Московского общества испытателей природы. – Т. 39. – Биотехнология – охране окружающей среды (под ред. проф. Садчикова А.П., д.б.н. Котелевцева С.В.): Материалы IV Международной научной конференции. – М.: Графикон, 2006. – С. 132–135.
4. Скворцова Л.Н. Использование пребиотиков при выращивании цыплят-бройлеров // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2010. – №3. – С. 38–40.
5. Скворцова Л., Беляев А. Влияние МЭК Вильзим F на развитие микробиоценоза и продуктивные качества цыплят // Птицеводство. – 2010. – №4. – С. 37–38.
6. Микробиологическая диагностика дисбактериозов: Методические рекомендации. – Киев. – 1986. – 27 с.
7. Плотицер С.М. Лабораторные диагностические исследования. – Киев: Здоровье, 1965. – С. 7–30.
8. Шендеров В.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание // Т. 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. – М.: Грантъ, 1998. – 288 с.
9. Сидоров М.А., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками // Ветеринария. – 2006. – № 11. – С. 17–22.
10. Панин А.Н., Малик Н.И. Пробиотики – неотъемлемый компонент рациона питания животных // Ветеринария. – 2006. – № 7. – С. 3–6.
11. Защитные механизмы птицы в постэмбриональном развитии / Б. Бессарабов, Л. Клетикова, О. Копоть, С. Алексеева // Птицеводство. – 2009. – № 10. – С. 46–47.

### LACTULOSA INFLUENCE ON MICROBIOCENOSIS FORMATION OF THE BROILER CHICKENS' ALIMENTARY TUBE

**T.V. Oliva, G.I. Gorshkov**

Belgorod State Agricultural Academy  
named after V. Gorin, 1 Vavilova St,  
Mayskiy Settl., Belgorod Reg., 308503,  
Russia

E-mail: olivatv@mail.ru

The experimental data are given on microbiocenosis formation in the crop, blind gut and rectum of 3- and 7-day-old broiler chickens which received prebiotic with lactulosa. Prebiotic stimulates the colonization of the intestines opening by beneficial microflora as early as in the first week of chicken's life. At the same time there is no adhesion of lacto- and bifidobacteria on the mucosal side of the upper digestive tract and blind gut and their lax adhesion in the rectum of 7-day-old chicken

Key words: broiler chicken, intestines microflora, adhesion, prebiotic, lactulosa.