

На правах рукописи

КАНИЧЕВА Ирина Владимировна

**ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА
В АНАТОМИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ ТОЛСТОГО
ОТДЕЛА КИШЕЧНИКА У ЯГНЯТ РОМАНОВСКОЙ ПО-
РОДЫ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва - 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет»

Научный руководитель -
доктор ветеринарных наук, доцент **Усачев Иван Иванович**

Официальные оппоненты:

Зайцева Елена Владимировна, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского», декан факультета

Плешакова Валентина Ивановна, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», заведующая кафедрой

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита состоится « ____ » _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр «Всероссийский научно - исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект 24 к. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://viev.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

И.Ю. Ездакова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Важной задачей в ветеринарии является снижение потерь новорожденных животных от болезней, сопровождающихся поражением органов пищеварения (Гукасян Г.Г., 2002; Крылов В.П., 2006; Сидоров М.А., 2006, 2008; Злобин С.В., 2008). Широкое применение в аграрном секторе удобрений и других химических компонентов негативно влияет на жизнедеятельность индигенных микроорганизмов в пищеварительной системе животных (Мищенко В.А., 2006; Головань В.Т., 2007; Романенко Л.В., 2008; Субботин В.В. 2008). Различные патогены, внедрившиеся в такой макроорганизм, сравнительно легче адаптируются и реализуют свой вирулентный потенциал (Сидоров М.А., 2000; Зорина В.В., 2004; Топурия Г.М., 2007; Топурия Л.Ю., 2007; Спиридонов Г.Н., 2007). Применение пробиотических препаратов требует глубоких знаний микрoэкологии отдельных биотопов системы пищеварения, в том числе толстого отдела кишечника животных (Rolfe R.D., 2000; Madsen K.L., 2001; Левахин В.И., 2006; Усачев И.И., Поляков В.Ф., 2007, 2007; Каничева И.В., Усачев И.И., 2016, 2016). Однако, у ягнят Романовской породы на ранних этапах жизни микробиоценоз слизистой оболочки и содержимого анатомических структур толстого отдела кишечника остается не выясненным (Чеченок Н.Н., 2013, Усачев И.И., 2014).

Следовательно, изучение особенностей микробиоценоза слизистой оболочки и содержимого слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят в период их раннего постнатального развития является важной задачей, имеющей научно теоретическое и практическое значение.

Степень разработанности темы. Широкое применение пробиотических препаратов подтвердило их эффективность, как стабилизаторов микрофлоры кишечника у животных (Сидоров М.А., 2000; Зорина В.В., 2004; Топурия Г.М., 2007; Madsen K.L., 2001). Выявлена прямая связь между микробиоценозом различных биотопов пищеварительной системы макроорганизма и составом микрофлоры применяемых пробиотиков (Зинченко Е.В., 2000; Бондаренко В. М.,

2003; Гужвинская С.А., 2013; Усачев И.И., 2016). Поэтому многие отечественные и зарубежные ученые работают над изучением микробиоценоза различных биотопов пищеварительной системы животных.

Цель и задачи исследований. Изучить формирование микробиоценоза в анатомических структурах толстого отдела кишечника, а именно: слизистой оболочке и содержимом слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят Романовской породы в раннем постнатальном онтогенезе (1 – 60 суток).

Для решения были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику морфометрических показателей слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят от 1 до 60 суточного возраста.

2. Изучить динамику бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий (*E. coli*), энтерококков, аэробных спорообразующих бацилл и кандид в слизистой оболочке и содержимом слепой, ободочной и прямой кишок ягнят.

3. Выяснить особенности количественного содержания и состава микробиальной флоры в анатомических структурах толстого отдела кишечника ягнят, первых двух месяцев жизни.

4. Провести сравнительную оценку накопления изучаемых микроорганизмов в слизистой оболочке, содержимом толстого отдела кишечника и фецесе ягнят в молозивный, молочный и смешанный периоды питания (1 – 60 суток).

Научная новизна. Установлены закономерности формирования микробиоценоза и накопления различных популяций микробиальной флоры: бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий, энтерококков, аэробных спорообразующих бацилл и кандид в слизистой оболочке и содержимом слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят Романовской породы в период их раннего постнатального развития (1 – 60 суток). Выявлены микроорганизмы, количественно доминирующие в изучаемом биотопе кишечника животных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлены особенности количественного содержания и качественного состава изучаемой микро-

флоры в слизистой оболочке и содержимом слепой, ободочной и прямой кишок ягнят Романовской породы в период раннего постнатального развития.

Разработаны и утверждены в установленном порядке Отделением ветеринарной медицины РАСХН:

- «Нормативы кишечной микрофлоры у овец»

Разработаны и утвержденные Управлением ветеринарии Брянской области:

- «Рекомендации по оценке микробиоценоза подвздошной, слепой, ободочной и прямой кишок ягнят в молозивный, молочный и смешанный периоды питания (1 – 60 суток)»

Методология и методы исследований. Объектами количественных и качественных лабораторных, и клинических исследований являлись овцы Романовской породы 3-5 лет, и ягнята в возрасте 1 – 60 суток. Применяли морфометрические, бактериологические и микологический методы исследований слизистой оболочки и содержимого слепой, ободочной, прямой кишок, а также фецеса подопытных животных.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Динамика морфометрических показателей слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят от 1 до 60 суточного возраста.

2. Динамика бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий (*E. coli*), энтерококков, аэробных спорообразующих бацилл и кандид в слизистой оболочке и содержимом слепой, ободочной и прямой кишок ягнят.

3. Особенности количественного содержания и состава микробиальной флоры в анатомических структурах толстого отдела кишечника ягнят, первых двух месяцев жизни.

4. Сравнительная оценка накопления изучаемых микроорганизмов в слизистой оболочке, содержимом толстого отдела кишечника и фецесе ягнят в молозивный, молочный и смешанный периоды питания (1 – 60 суток).

Степень достоверности и апробация работы. Клинические и лабораторные исследования проведены с использованием современных методов и элективных питательных сред стандартных по составу. Достоверность полученных результатов проанализирована и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Материалы исследований, полученные в ходе выполнения диссертации были представлены, обсуждены и получили положительную оценку на 26-й научной конференции студентов и аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Брянской ГСХА «Совершенствование технологии производства продукции животноводства, профилактики и лечения болезней» (г. Брянск, 20 мая 2010); Международной научно-практической конференции «Научные проблемы производства продукции животноводства и улучшения ее качества», посвященной 30-летию образования ФГОУ ВПО «Брянская государственная сельскохозяйственная академия» (Брянск, 23-24 июня 2010); II этапе Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза Российской Федерации в Центральном федеральном округе, в номинации «Ветеринарные науки» (Белгород, 28 апреля 2011); III этапе Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России, в номинации «Ветеринарные науки» (Ставрополь, 30-31 мая 2011); Материалах международной научно - практической конференции «Интенсивность и конкурентоспособность отраслей животноводства» (Брянск, 21 – 22 апреля 2016);

Межкафедральном совещании сотрудников института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ (2018)

Личный вклад соискателя. Все этапы работы, включающие планирование, подготовку и проведение экспериментов, а также статистическую обработку полученных результатов проведены автором самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно опубликованных статьях.

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 1 монография, 2 методические разработки и 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования диссертационных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические предложения, перспективы дальнейшей разработки темы, перечень сокращений, список литературы и приложения. Диссертационная работа изложена на 202 страницах компьютерного текста, содержит 30 таблиц, 33 рисунка. Список литературы включает 208 источника, из них 51 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в 2009 - 2016 гг. в экспериментальных условиях вивария кафедры терапии, хирургии ветеринарного акушерства и фармакологии ФГБОУ ВО Брянский ГАУ, а так же на базе крестьянско-фермерского хозяйства «А.А. Симонов», Выгоничского района Брянской области. Для проведения опыта было использовано 10 взрослых овец 3 - 5 – летнего возраста и 25 ягнят 1 - 60 суточного возраста Романовской породы, которые содержались с овцематками в индивидуальных клетках, размером 2,2 x 1,2 м. Предварительно, взрослые овцы были обследованы на туберкулез и бруцеллез серологическими и аллергическими методами с отрицательным результатом. Животные вакцинированы против сибирской язвы, обработаны против желудочно-кишечных паразитов препаратом «Альбендазол», согласно инструкции, индивидуально, per os. Исследования выполнены на клинически здоровых животных. Концентрацию и динамику бифидобактерий, лактобактерий, энтерококка, кишечной палочки, аэробных спорообразующих бацилл и кандид в фецесе, содержимом и слизистой оболочке слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят изучали в возрасте 1, 7, 15, 30, 60 суток, на уровне рода.

Содержание животных, уход и эвтаназию проводили в соответствии с требованиями приказов МСХ СССР № 755 от 12.08.1977 г., № 701 от 27.07.1978 г., «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (1986).

Морфометрические показатели слепой, ободочной и прямой кишок, а именно: массу каждой кишки устанавливали путем взвешивания на лабораторных весах с точностью до $\pm 0,1$ г (ГОСТ 7328-2001), длину кишок измеряли стандартной линейкой ГОСТ 17435-72. Ширину и толщину медиальных, проксимальных и дистальных участков слепой, ободочной и прямой кишок измеряли при помощи штангенциркуля и линейки.

Содержание вышеуказанных микроорганизмов в фекалиях подопытных животных изучали методом последовательных десятикратных разведений. Концентрацию интересующих нас микробов в химусе и слизистой оболочке проксимального, медиального и дистального участков слепой, ободочной и прямой кишок взрослых овец и ягнят определяли по А.А. Воробьеву (2003).

Количество выделенных микробов выражали в $\lg 10$ КОЕ / г мат. Учет выросших колоний микроорганизмов проводили через 24 часа, а кандид через 48 часов. Для определения количественных величин указанных микроорганизмов использовали элективные питательные среды: среду Блаурокка в модификации Гончарова Г.И. (1990) – для бифидобактерий, лактобакагар – для лактобактерий, энтерококкагар – для энтерококков, среду Эндо – для кишечной палочки, среду Сабуро – для кандид.

Концентрацию аэробных спорообразующих бацилл определяли на МПА. Предварительно испытуемый материал помещали в стеклянную стерильную пробирку и прогревали при 80°C в течение 20 минут. Полученные в процессе исследований цифровые значения были подвергнуты стандартной, принятой в биологии, статистической обработке, по Г.Ф. Лакину (1980).

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Динамика морфометрических показателей слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят в молозивный, молочный и смешанный периоды питания

Установлено, что у ягнят первых двух месяцев жизни рост и развитие каждой анатомической структуры толстого отдела кишечника индивидуальны.

Прямая кишка отличалась наиболее интенсивным ростом, а именно, 3,5% за одни сутки по сравнению с ее начальными размерами. Аналогичные критерии слепой и ободочной кишок подопытных ягнят не превышали 1,5% и 1,3% соответственно.

Таблица 1 - Длина слепой, ободочной и прямой кишок ягнят, ($M \pm m$), $n = 5$

| Возраст животных (сутки) | Название кишок | | | | | |
|--------------------------|-----------------|------|------------------|------|-----------------|-------|
| | Слепая (см) | | Ободочная (см) | | Прямая (см) | |
| | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % |
| 1 | 23,2 \pm 1,3* | 19,4 | 87,4 \pm 7,9* | 14,6 | 39,2 \pm 5,7* | 32,7 |
| 7 | 26,5 \pm 2,6* | 22,1 | 88,4 \pm 2,1* | 14,8 | 48,5 \pm 1,9* | 40,4 |
| 15 | 28,0 \pm 1,1* | 23,4 | 127,8 \pm 3,1* | 21,4 | 57,9 \pm 1,5* | 48,3 |
| 30 | 32,0 \pm 1,3* | 26,7 | 132,0 \pm 5,3* | 22,1 | 97,4 \pm 5,2* | 81,2 |
| 60 | 43,6 \pm 2,3* | 36,4 | 156,0 \pm 6,2* | 26,1 | 121,0 \pm 5,2 | 100,8 |
| Овцы 3 – 5 лет | 119,8 \pm 2,8 | 100 | 598,5 \pm 13,7 | 100 | 120,0 \pm 5,0 | 100 |

Примечание: * ($P \leq 0,05$) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

Выявлено, что у ягнят в возрасте шестидесяти суток размеры прямой кишки ягнят соответствовали размерам кишки у взрослых овец 3 – 5 летнего возраста. У ягнят указанного возраста размеры слепой и ободочной кишок не превышали 36,4% и 26,1% от размеров соответствующих кишок у контрольных овец.

Накопление массы слепой, ободочной и прямой кишок у подопытных ягнят происходит гораздо медленнее, чем увеличение их размеров: 27,7%; 17,4% и 30,2% соответственно по отношению к контрольным животным. Следует отметить, что у подопытных животных масса слепой кишки наиболее интенсивно

увеличивалась в смешанный период питания, а именно с 30 по 60 сутки их жизни - 162,9%.

Масса ободочной и прямой кишок наиболее интенсивно возрастала у ягнят с 15 по 30 сутки их жизни: 63,1% и 57,9%.

Таким образом, у ягнят первых двух месяцев жизни рост и развитие каждой анатомической структуры, входящей в состав толстого отдела кишечника индивидуальны, что необходимо учитывать при выборе различных компонентов, стимулирующих деятельность этих кишок у животных на ранних этапах их жизни (1 – 60 суток).

Таблица 2 - Масса слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят, ($M \pm m$), $n = 5$

| Возраст животных (сутки) | Название кишок | | | | | |
|--------------------------|----------------|------|---------------|------|------------|------|
| | Слепая (г) | | Ободочная (г) | | Прямая (г) | |
| | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % |
| 1 | 6,1±0,3* | 3,0 | 10,0±0,8* | 3,5 | 6,8±1,2* | 7,2 |
| 7 | 13,3±1,6* | 6,6 | 12,6±0,4* | 4,4 | 12,1±0,5* | 12,8 |
| 15 | 18,0±1,0* | 8,9 | 24,1±0,1* | 8,4 | 15,2±0,6* | 16,1 |
| 30 | 21,3±1,0* | 10,5 | 39,3±2,2* | 13,8 | 24,0±0,9* | 25,4 |
| 60 | 56,0±2,6* | 27,7 | 49,8±1,6* | 17,4 | 28,5±1,3* | 30,2 |
| Овцы 3 – 5 лет | 202,2±25,0 | 100 | 285,6±42,3 | 100 | 94,4±2,8 | 100 |

Примечание: * ($P \leq 0,05$) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

2.3. Микробиоценоз слизистой оболочки и химуса слепой кишки ягнят

Установлено, что в слепой кишке ягнят односуточного возраста, при минимальной концентрации изучаемых микроорганизмов 17,6 lg КОЕ/ г слиз. – 18,2 lg КОЕ/ г хим. их содержание в химусе было выше, чем в слизистой оболочке этой кишки на 3,4 %.

У ягнят семисуточного возраста изучаемые биоптаты, полученные из слепой кишки, содержали одинаковые величины интересующих нас микроорганизмов – 29,6 lg КОЕ/ г мат. Выявлено, что у подопытных животных в возрасте 15, 30 и 60 суток в слизистой оболочке этой кишки, суммарный уровень микробов был выше, чем в химусе на 2,7%, 4,7% и 4,2% соответственно.

Таблица 3 - Содержание микроорганизмов в химусе и слизистой оболочке слепой кишки ягнят и овец 3 – 5 летнего возраста (n = 5; $M \pm m \lg 10$ КОЕ/ г мат.)

| Микроорганизмы (рода) | Возраст животных (сутки) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|--------------|--------------------|
| | 1 | | 7 | | 15 | | 30 | | 60 | | Овцы 3-5 лет | |
| | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка |
| Bifidobacterium | 5,0±0* | 5,0±0* | 10,8±0,2* | 11,0±0* | 11,6±0,2* | 12,4±0,2* | 12,8±0,4* | 13,2±0,4* | 11,6±0,6* | 11,2±0,6* | 12,0±0,6 | 11,8±0,6 |
| Lactobacillus | 3,4±0,2* | 3,0±0* | 5,2±0,2* | 5,2±0,2* | 7,4±0,2* | 7,4±0,6* | 6,0±0* | 6,8±0,4* | 7,4±0,6 | 7,8±0,4 | 7,8±0,4 | 8,0±0,4 |
| Escherichia (E. coli) | 4,0±0* | 4,0±0* | 9,0±0,4 | 9,6±0,2* | 9,4±0,6 | 9,4±0,6* | 9,4±0,2 | 9,4±0,2* | 9,8±0,4 | 10,4±0,2 | 9,4±0,2 | 10,4±0,4 |
| Enterococcus | 3,0±0* | 2,6±0,2* | 2,2±0,2* | 2,4±0,2* | 3,0±0* | 3,0±0* | 2,0±0* | 1,2±0,4* | 1,8±0,4* | 1,8±0,4* | 0,6±0,2 | 0,6±0,2 |
| Bacillus | 0,4±0,2* | 0,6±0,2* | 0,6±0,2 | 0,2±0,2* | 1,8±0,2* | 1,8±0,2* | 2,4±0,2* | 3,4±0,2* | 0,6±0,2 | 1,4±0,2* | 0,6±0,2 | 1,0±0 |
| Candida | 2,4±0,2* | 2,4±0,2* | 1,8±0,2* | 1,2±0,2* | 2,0±0* | 2,2±0,2* | 0,2±0,2* | 0,4±0,4 | 0,8±0* | 0,8±0,2* | 1,4±0,2 | 0,6±0,2 |

Примечание: * ($P \leq 0,05$) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

Установлено так же, что у ягнят с первых по шестидесятые сутки их жизни, как и у взрослых животных контрольной группы 3 – 5 лет, в этой анатомической структуре толстого отдела кишечника, бифидобактерии, лактобактерии и кишечная палочка доминировали над энтерококками, аэробными спорообразующими бациллами и кандидами, составляя при этом 68,2%, 87,2%, 80,7%, 85,5%, 88,0% и 93,2% соответственно.

2.4. Микробиоценоз слизистой оболочки и химуса ободочной кишки ягнят

Результаты исследований показали, что в содержимом и слизистой оболочке ободочной кишки ягнят односуточного возраста присутствуют представители всех изучаемых родов микрофлоры: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* (*E. coli*), *Enterococcus*, *Bacillus* и *Candida*.

У односуточных животных концентрация этих микробов в слизистой оболочке и химусе указанной кишки отличалась на 11,4%, а их абсолютные величины находились в пределах 17,6 lg КОЕ/ г слиз. и 19,6 lg КОЕ/ г хим. У животных в возрасте 1, 15, 30 суток, и у овец контрольной группы 3-5 лет, в химусе ободочной кишки, суммарное содержание изучаемых микробов на 11,0%, 8,1%, 7,9% и 3,3%, выше, чем в ее слизистой оболочке. Исключение составляли ягнята 7 и 60 суточного возраста, у которых слизистая оболочка ободочной кишки была богаче изучаемыми микробами, чем ее химус на 1,9% и 3,6% соответственно.

Установлено, что у ягнят 30 и 60 суточного возраста, как и у взрослых животных в возрасте 3 – 5 лет, в слизистой оболочке слепой и ободочной кишок содержание изучаемых микроорганизмов было весьма близким, а количественные отличия не превышали 0,1%, 0,6% соответственно. Представленные данные подтверждают стабильность микробиоценоза, как одной из важнейших систем жизнеобеспечения животных указанного возраста.

Таблица 4 - Содержание микроорганизмов в химусе и слизистой оболочке ободочной кишки ягнят и овец 3 – 5 летнего возраста (n = 5; M ± m lg 10 КОЕ/ г мат.)

| Микроорганизмы (рода) | Возраст животных (сутки) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|--------------|--------------------|
| | 1 | | 7 | | 15 | | 30 | | 60 | | Овцы 3-5 лет | |
| | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка | химус | слизистая оболочка |
| Bifidobacterium | 6,2±0,2* | 5,4±0,2* | 10,8±0,2 | 10,8±0,2* | 10,4±0,2 | 11,6±0,2 | 13,0±0,4* | 13,2±0,2* | 12,4±0,2* | 12,4±0,2* | 10,8±0,4 | 11,2±0,4 |
| Lactobacillus | 4,0±0* | 3,4±0,2* | 6,2±0,4* | 7,0±0,4 | 8,0±0* | 6,8±0,4 | 7,0±0,4 | 6,0±0,6* | 6,8±0,4* | 7,2±0,4 | 7,4±0,2 | 7,0±0,4 |
| Escherichia (E. coli) | 4,4±0,2* | 4,2±0,2* | 9,2±0,4* | 10,0±0 | 10,6±0,2* | 10,0±0,4 | 9,6±0,2 | 9,2±0,4* | 10,4±0,2* | 11±0* | 9,8±0,2 | 9,8±0,2 |
| Enterococcus | 3,0±0* | 2,8±0,2* | 3,0±0,4* | 3,0±0,4* | 3,4±0,2* | 2,0±0,4* | 2,4±0,2* | 1,0±0 | 2,2±0,2* | 2,2±0,2* | 1,0±0 | 1,0±0 |
| Bacillus | 0,4±0,2* | 0,2±0,2* | 1,0±0 | 0,2±0,2* | 0,4±0,2 | 0,6±0,2* | 3,4±0,2* | 3,0±0,4* | 1,8±0,4* | 1,4±0,2* | 0,8±0,2 | 0,4±0,2 |
| Candida | 1,6±0,4* | 1,6±0,2* | 1,6±0,2* | 1,4±0,2* | 1,8±0,2* | 1,0±0,2* | 0,2±0,2* | 0,6±0,2 | 0,2±0,2* | 0,8±0,2* | 1,2±0,2 | 0,6±0,2 |

Примечание: * (P≤0,05) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

В ободочной кишке ягнят в молозивный, молочный и смешанный период питания, до 60 суточного их возраста, как и у овец контрольной группы, преобладающие величины принадлежат бифидобактериям, лактобактериям и эшерихиям (*E. coli*), суммарное содержание которых находилось в пределах: 73,9%, 80,3%, 88,8%, 86,1%, 87,4% и 93,3% соответственно для каждого возраста животных.

2.5. Микробиоценоз слизистой оболочки и содержимого прямой кишки ягнят

Нами выявлено, что у ягнят от рождения до двухмесячного возраста, в содержимом и слизистой оболочке прямой кишки накопление изучаемых микробов происходит неодинаково и тесно взаимосвязано с периодом питания животных.

У ягнят односуточного возраста в этой кишке присутствуют все интересующие нас микроорганизмы, содержание которых находилось на уровне 15,0 lg КОЕ/ г слиз. и 18,4 lg КОЕ / г хим. Слизистая оболочка прямой кишки ягнят указанного возраста беднее микрофлорой, чем ее содержимое на 22,7%.

У ягнят семисуточного и тридцати суточного возраста слизистая оболочка прямой кишки богаче изучаемой микрофлорой, чем ее содержимое на 7,3% и 2,8%, соответственно. Исключение составляли ягнята пятнадцати суточного возраста, у которых указанные биоптаты, полученные из прямой кишки содержали одинаковую концентрацию изучаемых микробов: 36,0 lg КОЕ/ г сод. и 36,2 lg КОЕ/ г слиз.

Установлено, что у ягнят в период раннего постнатального онтогенеза (1 – 60 суток), а так же у контрольных овец в исследуемых биоптатах, полученных из прямой кишки, представители родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Escherichia* (*E. coli*), количественно доминировали над энтерококками, аэробными спорообразующими бациллами и кандидами, составляя 66,7%, 74,7%, 81,8%, 80,7%, 74,4% и 69,1% соответственно.

Таблица 5 - Содержание микроорганизмов в содержимом и слизистой оболочке прямой кишки ягнят и овец 3 – 5 летнего возраста (n = 5; M ± m lg 10 КОЕ/ г мат.)

| Микроорганизмы (рода) | Возраст животных (сутки) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|--------------|--------------------|
| | 1 | | 7 | | 15 | | 30 | | 60 | | Овцы 3-5 лет | |
| | содержимое | слизистая оболочка | содержимое | слизистая оболочка | содержимое | слизистая оболочка | содержимое | слизистая оболочка | содержимое | слизистая оболочка | содержимое | слизистая оболочка |
| Bifidobacterium | 5,4±0,2* | 5,2±0,2* | 8,2±0,2* | 10,6±0,2 | 10,2±0,2 | 11,4±0,2* | 9,6±0,2 | 9,2±0,2* | 9,4±0,2* | 8,4±0,2* | 10,0±0,4 | 10,4±0,2 |
| Lactobacillus | 3,4±0,2* | 2,2±0,2* | 7,2±0,2* | 6,2±0,4* | 8,2±0,2 | 8,2±0,2* | 7,8±0,4 | 9±0* | 8,0±0 | 5,2±0,2 | 8,0±0,2 | 5,0±0,4 |
| Escherichia (E. coli) | 2,8±0,2* | 2,6±0,2* | 6,4±0,2* | 7,4±0,2 | 7,6±0,2* | 10±0,6* | 10,2±0,4* | 11±0* | 7,4±0,2 | 5,6±0,2* | 7,2±0,4 | 7,0±0,4 |
| Enterococcus | 3,0±0* | 2,4±0,2* | 3,4±0,2* | 3,6±0,2* | 4,4±0,2* | 4±0,4 | 2,4±0,2* | 2,4±0,2* | 4,8±0,2* | 2,2±0,2* | 5,8±0,4 | 4,2±0,2 |
| Bacillus | 1,6±0,2* | 0,8±0,2* | 2,8±0,4* | 2,2±0,4* | 3,2±0,4* | 0,4±0,4* | 2,8±0,4* | 3,2±0,2* | 5,0±0* | 2,4±0,2* | 5,6±0,4 | 4,2±0,4 |
| Candida | 2,2±0,2 | 1,8±0,2* | 2,2±0,2 | 2,4±0,2* | 2,4±0,2 | 2,2±0,2* | 2,4±0,2 | 1,4±0,2* | 0,6±0,2* | 2±0,2* | 2,2±0,2 | 1,6±0,2 |

Примечание: * (P≤0,05) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

У подопытных ягнят 30 и 60 суточного возраста, а так же у контрольных овец в возрасте 3 – 5 лет, концентрация изучаемых микробов в слизистой оболочке и содержимом прямой кишки ниже, чем в аналогичных биоптатах, полученных из слепой и ободочной кишок на 4,8% – 5,4%, 13,6% - 14,4% и 24,4% соответственно.

2.6. Микробиоценоз слизистой оболочки и содержимого толстого отдела кишечника ягнят

Анализ полученных данных показал, что у ягнят односуточного возраста концентрация бифидобактерий, лактобактерий, кишечной палочки, энтерококков, аэробных спорообразующих бацилл и кандид в слизистой оболочке толстого отдела кишечника меньше, чем в его содержимом на 12,0%. Выявленная особенность указывает, что у новорожденных ягнят в этом отделе кишечника, как единой части пищеварительной системы, просветная микрофлора количественно преобладает над пристеночной.

У ягнят в возрасте семи суток, то есть к концу молозивного периода питания, в слизистой оболочке толстого отдела кишечника накапливается 99,7% изучаемых микроорганизмов. В молочный и смешанный периоды питания (15, 30 и 60 суток) содержание микроорганизмов в изучаемом биоптате соответствовала аналогичному критерию овец контрольной группы: 34,8 lg КОЕ/ г слиз., 34,6 lg КОЕ/ г слиз., 31,4 lg КОЕ/ г слиз. и 31,6 lg КОЕ/ г слиз. соответственно.

Установлено, что в содержимом, как и в слизистой оболочке толстого отдела кишечника ягнят от рождения до двухмесячного возраста, накопление каждой популяции изучаемых микробов носит индивидуальный характер.

У ягнят 15, 30 и 60 суточного возраста в содержимом толстого отдела кишечника бифидобактерии, лактобактерии и кишечная палочка, количественно доминировавшие над остальными микробами, стабилизировались на уровне 10,7 – 11,1 lg КОЕ/ г сод., 7,4 – 7,9 lg КОЕ/ г сод. и 9,2 – 9,7 lg КОЕ/ г сод. соответственно.

Таблица 6 - Концентрация микроорганизмов в слизистой оболочке толстого отдела кишечника ягнят и овец 3 – 5 летнего возраста (n = 5; M ± m lg 10 КОЕ/ г слиз.)

| Возраст животных (сутки) | Bifidobacterium | | Lactobacillus | | Escherichia (E. coli) | | Enterococcus | | Bacillus | | Candida | |
|--------------------------|-----------------|-------|---------------|-------|-----------------------|-------|--------------|-------|----------|-------|----------|-------|
| | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % |
| 1 | 5,2±0,1* | 46,7 | 2,9±0,1* | 43,0 | 3,6±0,1* | 39,7 | 2,6±0,2* | 134,5 | 0,5±0,2* | 28,6 | 1,9±0,2* | 207,1 |
| 7 | 10,8±0,1 | 97,0 | 6,1±0,3* | 92,0 | 9,0±0,1 | 99,3 | 3,0±0,3* | 155,2 | 0,9±0,3* | 46,4 | 1,7±0,2* | 178,6 |
| 15 | 11,8±0,2* | 106,0 | 7,5±0,4* | 112,0 | 9,8±0,5* | 108,1 | 3,0±0,3* | 155,2 | 0,9±0,3* | 50,0 | 1,8±0,2* | 192,9 |
| 30 | 11,9±0,3* | 106,6 | 7,3±0,3* | 109,0 | 9,9±0,2* | 108,8 | 1,5±0,2* | 79,3 | 3,2±0,3* | 171,4 | 0,8±0,3* | 85,7 |
| 60 | 10,7±0,3 | 95,8 | 6,7±0,3 | 101,0 | 9,0±0,1 | 99,3 | 2,1±0,3* | 106,9 | 1,7±0,2* | 92,9 | 1,2±0,2* | 128,6 |
| Овцы 3 – 5 лет | 11,1±0,4 | 100,0 | 6,7±0,4 | 100,0 | 9,1±0,3 | 100,0 | 1,9±0,1 | 100,0 | 1,9±0,2 | 100,0 | 0,9±0,2 | 100,0 |

Примечание: * (P≤0,05) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

Таблица 7 - Концентрация микроорганизмов в содержимом толстого отдела кишечника ягнят и овец 3 – 5 летнего возраста (n = 5; M ± m lg 10 КОЕ/ г мат.)

| Возраст животных (сутки) | Bifidobacterium | | Lactobacillus | | Escherichia (E. coli) | | Enterococcus | | Bacillus | | Candida | |
|--------------------------|-----------------|-------|---------------|-------|-----------------------|-------|--------------|-------|----------|-------|----------|-------|
| | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % | M ± m | % |
| 1 | 5,5±0,1* | 50,6 | 3,6±0,1* | 46,6 | 3,7±0,1* | 42,4 | 3,0±0* | 121,6 | 0,8±0,2* | 34,3 | 2,1±0,3* | 129,2 |
| 7 | 9,9±0,2* | 90,9 | 6,2±0,3* | 80,2 | 8,2±0,3* | 93,2 | 2,9±0,3* | 116,2 | 1,5±0,2* | 62,9 | 1,9±0,2* | 116,7 |
| 15 | 10,7±0,2 | 98,2 | 7,9±0,1 | 101,7 | 9,2±0,3 | 104,5 | 3,6±0,1* | 145,9 | 1,8±0,3* | 77,1 | 2,1±0,1* | 129,2 |
| 30 | 11,8±0,3* | 107,9 | 6,9±0,3* | 89,7 | 9,7±0,3* | 110,6 | 2,3±0,1* | 91,9 | 2,9±0,3* | 122,9 | 0,9±0,2* | 58,3 |
| 60 | 11,1±0,3 | 101,8 | 7,4±0,3 | 95,7 | 9,2±0,3 | 104,5 | 2,9±0,3* | 118,9 | 2,5±0,2 | 105,7 | 0,5±0,1* | 33,3 |
| Овцы 3 – 5 лет | 10,9±0,5 | 100,0 | 7,7±0,3 | 100,0 | 8,8±0,3 | 100,0 | 2,5±0,2 | 100,0 | 2,3±0,3 | 100,0 | 1,6±0,2 | 100,0 |

Примечание: * (P≤0,05) – статистически достоверные результаты по отношению к овцам 3 – 5 лет.

Таблица 8 - Концентрация микроорганизмов в фекалиях ягнят в молозивный, молочный и смешанный периоды питания (1 – 60 суток)
(n = 5; M ± m lg 10 КОЕ/ г фек.)

| Микроорганизмы (рода) | Возраст животных (сутки) | | | | |
|--------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 7 | 15 | 30 | 60 |
| | M±m | M±m | M±m | M±m | M±m |
| Bifidobacterium | 2,8±0,2* | 8,0±0,2* | 9,8±0,2 | 9,6±0,2 | 9,8±0,2 |
| Lactobacillus | 2,3±0,3* | 7,0±0,2* | 8,0 ±0,2 | 8,0 ±0,2 | 8,0 ±0,2 |
| Escherichia (E. coli) | 2,1±0,2* | 6,6±0,2* | 7,6±0,2 | 7,6±0,2 | 7,6±0,2 |
| Enterococcus | 2,3±0,3* | 5,4±0,2* | 6,0±0,2 | 6,0±0,2 | 6,0±0,2 |
| Bacillus | 1,2±0,2* | 5,0±0,2* | 5,2±0,2 | 5,6±0,3 | 5,4±0,2 |
| Candida | 1,0±0,1* | 3,0±0,2 | 3,0±0,3 | 3,5±0,2* | 3,0±0,2 |

Примечание: * (P≤0,05) – статистически достоверные результаты по отношению к животным 60 суточного возраста

В фецесе подопытных ягнят количественные величины эти микробов стабилизировались, также к концу молочного периода питания в пределах: 9,6 – 9,8 lg КОЕ/ г фек., 8,0 lg КОЕ/ г фек., 7,6 lg КОЕ/ г фек., 6,0 lg КОЕ/ г фек., 5,2-5,6 lg КОЕ/ г фек. и 3,0-3,5 lg КОЕ/ г фек. соответственно для каждой популяции микрофлоры.

Следовательно, микробиоценоз (в пределах изучаемых нами микробов) слизистой оболочки и содержимого каждой кишки, а так же толстого отдела кишечника в целом, тесно взаимосвязан с периодом питания и качеством пищи поступающей в организм ягнят. Его формирование происходит в период молозивного и молочного (1 – 15 суток) питания животных

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что толстый отдел кишечника животных, в частности овец, хотя и является единой частью пищеварительной системы, формирование микробиоценоза в слепой, ободочной и прямой кишках животного носит индивидуальный характер.

Как индивидуальны состав и содержание изучаемой нами микробиоты в различных биоптатах (слизистая оболочка, содержимое) полученных из одной и той же анатомической структуры входящей в состав толстого отдела кишечника подопытных и контрольных овец.

К общим закономерностям, характеризующим формирование микробиоценоза толстого кишечника ягнят Романовской породы на ранних этапах их жизни, следует отнести количественное превосходство бифидобактерий, лактобактерий и кишечной палочки в слизистой оболочке и содержимом у исследуемых животных.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что у ягнят в течение первых двух месяцев жизни ни одна кишка входящая в состав толстого отдела кишечника не достигает своей морфометрической стабильности, а размеры и масса слепой, ободочной, прямой кишок у шестидесятисуточных животных составляют 36,4%, 26,1%, 100,8% и 27,7%, 17,4%, 30,2% от аналогичных кишок контрольных овец 3 – 5 летнего возраста.

2. Показано, что микробиоценоз (на уровне рода) слизистой оболочки и содержимого толстого отдела кишечника ягнят в составе *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* (*E. coli*), *Enterococcus*, *Bacillus* и *Candida* формируется в процессе молозивного и молочного периодов питания животных. Каждая кишка, входящая в его состав, отличается концентрацией и динамикой изучаемой микрофлоры, присутствующей в слизистой оболочке и содержимом.

3. Установлено, что у ягнят 1, 7, 15, 30 и 60 суточного возраста микробиоценоз слизистой оболочки и химуса слепой кишки представлен преимуще-

ственно бифидобактериями, лактобактериями и кишечной палочкой - 68,2%, 87,2%, 80,7%, 85,5% и 88,0%. У животных в возрасте 15, 30 и 60 суток исследуемые биоптаты этой кишки отличаются содержанием микробов на 2,7%, 4,7% и 4,2% соответственно.

4. Результаты исследований свидетельствуют, что у ягнят первых двух месяцев жизни в слизистой оболочке и химусе ободочной кишки, концентрация бифидобактерий, лактобактерий и кишечной палочки, количественно преобладающих над остальными микробами, составляет: 73,9%, 80,3%, 88,8%, 86,1% и 87,4% соответственно. Слизистая оболочка этой кишки животных шестидесятисуточного возраста богаче изучаемой микрофлорой, чем ее химус на 3,6%.

5. Исследования показали, что у ягнят в период их раннего постнатального развития (1 – 60 суток) в слизистой оболочке и содержимом прямой кишки бифидобактерии, лактобактерии и эшерихии (*E. coli*) доминировали над энтерококками, аэробными спорообразующими бациллами и кандидами, составляя 66,7%, 74,7%, 81,8%, 80,7% и 74,4%. У животных 7 и 30 суточного возраста, в слизистой оболочке прямой кишки, концентрация этих микробов выше, чем в химусе на 7,2% и 2,8% соответственно.

6. Выяснено, что у ягнят 15, 30 и 60 суточного возраста микробиоценоз слизистой оболочки и содержимого слепой, ободочной и прямой кишок, а также фецеса в количественном отношении представляет стабильную систему, где абсолютные величины изучаемых микроорганизмов находятся в пределах: 33,4 – 36,2 lg КОЕ / г слиз. и 32,0 – 35,2 lg КОЕ / г хим.; 32,0 – 35,0 lg КОЕ / г слиз. и 33,8 – 34,6 lg КОЕ / г хим.; 25,8 – 36,2 lg КОЕ / г слиз. и 35,2 – 36,0 lg КОЕ / г сод.; 39,6 – 39,8 lg КОЕ / г фек.

7. Установлено, что у овец объективная оценка микробиоценоза толстого отдела кишечника возможна только на основании результатов исследования микрофлоры химуса и слизистой оболочки каждой анатомической структуры, входящей в его состав. Поскольку концентрация микроорганизмов в 1 грамме

слизистой оболочки слепой, ободочной и прямой кишок может быть выше, чем в аналогичном количестве содержимого этих кишок, судить о состоянии микробиоценоза указанной части пищеварительной системы только по химусу, а тем более по фецесу, невозможно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты наших исследований рекомендуем в качестве нормативов, а также при выборе бактерий - пробионтов и разработке пробиотических композиций, применяемых с целью поддержания стабильной микрофлоры в слизистой оболочке и содержимом слепой, ободочной и прямой кишок у ягнят в период их раннего постнатального развития, а именно 1 – 60 суток.

2. Предлагаем наши методические разработки использовать в системе диспансеризационных мероприятий при контроле за состоянием здоровья и его поддержанием у овец в личных подсобных и крестьянских фермерских хозяйствах Брянской области.

3. Результаты диссертационной работы рекомендуем использовать в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно – практических занятий по клиническим дисциплинам ветеринарного профиля, а так же в научно – исследовательской и практической деятельности ветеринарных специалистов.

4. Результаты количественного содержания и состава изучаемых микробов, присутствующих в слизистой оболочке и содержимом каждой анатомической структуры толстого отдела кишечника ягнят Романовской породы в молочный, молочный и смешанный периоды питания, предлагаем использовать в качестве клинических, диагностических и прогностических критериев, при оценке микробиального гомеостаза. При выборе препаратов и бактерий - пробионтов, применяемых для поддержания стабильной микрофлоры в этой части пищеварительной системы овец, в период их раннего постнатального развития (1 – 60 суток)

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования по представленной теме позволят углубить и расширить научно теоритическое и экспериментальное обоснование выбора бактерий пробионтов входящих в состав препаратов, применяемых для стабилизации микробиоценоза толстого отдела кишечника у животных в процессе их жизнедеятельности.

Перспективность подобного рода исследований заключается еще и в том, что они позволяют выявить и научно обосновать причинно - следственную связь в системе животное - биотоп пищеварительной системы – патология – препарат стабилизирующий кишечный микробиоценоз.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Монография:

1. Усачев И.И. Микробиоценоз анатомических структур толстого отдела кишечника ягнят Романовской породы в раннем постнатальном онтогенезе / И.И. Усачев, И.В. Каничева, В.Ф. Поляков. - Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2016. - 209с.

Методические разработки:

2. Нормативы кишечной микрофлоры у овец: методические положения / И.И. Усачев, В.Ф. Поляков. В.В. Пономарев, Н.Н. Чеченок, К.И. Усачев, И.В. Каничева, О.В. Гомонова. – Брянск: Изд-во Брянская ГСХА, 2013. - 48 с.

3. Рекомендации по оценке микробиоценоза подвздошной, слепой, ободочной и прямой кишок ягнят в молозивный, молочный и смешанный периоды питания (1 – 60 суток) / И.И. Усачев, В.Ф. Поляков, И.В. Каничева, К.И. Усачев. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2015. - 165 с.

Публикации в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

4. Каничева И.В. Микробиоценоз слизистых оболочек толстого отдела кишечника ягнят раннего возраста / И.В. Каничева //Вестник Орел ГАУ, 2012. -№ 1.- (34). - С. 119-121.

5. Каничева И.В. Микробиоценоз содержимого толстого отдела кишечника ягнят раннего возраста / И.В. Каничева // Вестник Орел ГАУ, 2012. - № 4 (37) - С. 107-109.

6. Каничева И.В. Динамика различных представителей кишечной микрофлоры в слизистой оболочке и химусе слепой кишки ягнят в молочивный, молочный и смешанный периоды питания / И.В. Каничева, И.И. Усачев, В.Ф. Поляков // Вестник Бурятской ГСХА, 2016. - № 2 (43). - С. 53 - 58.

7. Каничева И.В. Особенности формирования микробиоценоза слизистой оболочки и содержимого ободочной кишки у ягнят раннего возраста / И.В. Каничева, И.И. Усачев, В.Ф. Поляков // Вестник Бурятской ГСХА, 2016. - № 4 (45).- С. 59-66.

Публикации в других периодических изданиях и научных конференциях:

8. Усачев И.И. Динамика микрофлоры химуса толстого отдела кишечника взрослых овец в современных экологических условиях / И.И. Усачев, И.В. Мельникова // Экологические и селекционные проблемы племенного животноводства. - Брянск: Изд-во Брянская ГСХА, 2009. Вып. 2. - С. 104-105.

9. Мельникова И.В. Микробиоценоз слизистых оболочек толстого отдела кишечника взрослых овец / И.В. Мельникова, И.И. Усачев // Международная научно-практическая конференция «Научные проблемы производства продукции животноводства и улучшения её качества». – Брянск: Изд-во Брянская ГСХА, 2010. - С. 362-365.

10. Мельникова И.В. Сравнительная оценка уровней микроорганизмов в содержимом и слизистой оболочке толстого отдела кишечника овец / И.В. Мельникова, И.И. Усачев // Международная научно-практическая конференция «Научные проблемы производства продукции животноводства и улучшения её качества». - Брянск: Изд-во Брянская ГСХА, 2010. - С. 366-369.

11. Мельникова И.В. Сравнительная оценка содержания микроорганизмов в слизистых оболочках толстого отдела кишечника и фекалиях взрослых овец / И.В. Мельникова, И.И. Усачев // Экологические и селекционные

проблемы племенного животноводства. - Брянск: Изд-во Брянская ГСХА,2010.
– Вып. 4.- С. 90-91.

Автор выражает благодарность за оказание научно – методической помощи доктору биологических наук, профессору В.Ф. Полякову.