

УДК 636.4.053:636.087.74 (043.3)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ С α -ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОПЫТАХ IN VIVO

И. А. Захарова, А. Н. Михалюк

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: кормовая добавка на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью, лабораторные животные, эффективность.

Аннотация. В результате исследований установлено, что использование кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью способствует активизации гемопоэза и окислительно-восстановительных реакций организма, что выразилось в повышении концентрации эритроцитов на 7,8 % и гемоглобина – на 6,2 % в сравнении с контролем, повышении неспецифической и специфической защиты организма, нормализации функционального состояния печени (дезаминирующей функции) и почек (способности выводить продукты азотистого обмена), что выразилось в снижении концентрации в сыворотке крови креатинина на 31,3 % и мочевины на 19,4 %, а также стимуляции роста и развития животных.

EFFICIENCY OF USING A FEED ADDITIVE BASED ON PROBIOTIC BACTERIA WITH α -GALACTOSIDASE ACTIVITY IN VIVO EXPERIMENTS

I. A. Zakharova, A. N. Mikhalyuk

EI «Grodno state agrarian university»
Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Terreshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: feed additive based on probiotic bacteria with α -galactosidase activity, laboratory animals, efficiency.

Summary. As a result of research, it was found that the use of a feed additive based on probiotic bacteria with α -galactosidase activity increases the activity of hematoipoiesis and redox reactions of the organ-organism, which increases in the concentration of red blood cells by 7,8 % and hemoglobin – by 6,2 % in anticipation with the identification of non-specific and specific protection of the body, normalization of the functional state of the liver (de-mining function) and kidneys (the ability to excrete products of nitrogen metabolism), which is enhanced by a decrease in the concentration of creatinine in the blood serum by 31,3 % and urea – by 19,4 %, as well as stimulation of growth and development of animals.

(Поступила в редакцию 01.06.2023 г.)

Введение. В последнее время наибольшую популярность приобретают кормовые добавки, позволяющие улучшить эффективность производства, путем ликвидации дефицита кормового белка [1]. Большой интерес в кормопроизводстве вызывают бобовые и зернобобовые культуры, которые обладают высокой питательной ценностью. Однако данные культуры содержат трудно утилизируемые олиго- и полисахариды, ингибиторы пищеварительных ферментов и другие антипитательные вещества, препятствующие усвоению белков [2]. В этой связи особый интерес представляет разработка кормовой добавки, объединяющей функции пробиотиков и ферментов, расщепляющих поли- и олигосахариды.

Кормовая добавка с альфа-галактозидазной активностью обеспечит гидролиз олигосахаридов до моносахаров, их усвоение клетками слизистой оболочки кишечника и использование в организме в качестве источника энергии, при этом ограничив поступление олигосахаридов в толстый кишечник в нерасщепленном виде, где они подвергаются анаэробному бактериальному гидролизу с образованием газов [3]. Благодаря пробиотическим свойствам добавка будет подавлять развитие патогенных микроорганизмов, способствовать нормализации функций желудочно-кишечного тракта [4].

Цель работы – испытать эффективность кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью на лабораторных животных в опытах *in vivo*.

Материал и методика исследований. В результате проведенного скрининга в состав кормовой добавки отобраны штаммы молочнокислых бактерий *Leuconostoc mesenteroides* M1, *Lactobacillus pentosus* HE-1, *Lactobacillus paraplantarum* HE-22, *Lactobacillus plantarum* HE-2, характеризующиеся наиболее высоким уровнем α -галактозидазной активности при культивировании на средах с разными источниками углерода. Расщепление α -D-галактозидной связи катализирует α -галактозидаза (ЕС 3.2.1.22; α -Гал).

Исследования проводились в виварии и научно-исследовательской лабораторией «АгроВет» УО «Гродненский государственный аграрный университет».

С целью изучения эффективности использования кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью был проведен научный опыт на 20-ти беспородных белых крысах (самках) массой 149-153 г в возрасте 2 месяцев, которые были разделены на 2 группы: контрольную и опытную, согласно приведенной схеме (таблица 1). Животные контрольной группы получали стандартный рацион вивария и воду. Животным опытной группы дополнительно

скармливали кормовую добавку на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью (титр ~ не менее $1,5 \times 10^{10}$ КОЕ/г). Кормление производили один раз в день в утренние часы, замену подстилки – три раза в неделю. За 12 часов до забоя животных лишали корма. Скармливание крысам общего рациона и кормовой добавки осуществляли в течение 14 суток с постоянным наблюдением за лабораторными объектами.

Таблица 1 – Схема опыта

Группы	Кол-во животных в группе, гол.	Продолжительность опыта, дней	Условия проведения опыта
Контрольная	10	14	ОР (основной рацион)
Опытная	10	14	ОР + кормовая добавка на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью (титр ~ не менее $1,5 \times 10^{10}$ КОЕ/г)

Контроль за сохранностью и падежом осуществляли ежедневно. Во время эксперимента учитывались следующие показатели: внешний вид, поведение, потребление корма и воды, изменение массы тела, морфологические и биохимические показатели крови, патоморфологические изменения органов.

В конце опыта лабораторные животные подвергались эвтаназии путем декапитации и вскрытию. При вскрытии органы выделялись единым органомкомплексом с последующим взвешиванием отдельных органов и визуальной оценкой их состояния.

Комплекс методов исследований и контроля функционального состояния организма, использованных в данной работе, подобрали так, чтобы можно было оценить в динамике становление и границы функциональных возможностей организма.

Использовали общие (основные) и дополнительные лабораторные методы исследований.

В цельной крови у животных определяли количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина и гематокритную величину с помощью гематологического анализатора MYTHIC 18 – 3 diff (ORPHEE MEDICAL, Швейцария). Все биохимические показатели сыворотки крови крыс определяли на биохимическом анализаторе DIALAB AutolyzerISE. Сыворотку крови получали выдерживанием крови в течение двух часов при комнатной температуре с последующим отделением свернувшейся крови от стенки пробирки стеклянной палочкой и центрифугированием.

Биометрическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютера в программе Microsoft Excel методами вариационной статистики. Все результаты исследований в работе приведены к Международной системе единиц СИ. Определены средние арифметические каждого вариационного ряда, стандартные ошибки средней, степень вероятности нулевой гипотезы по сравнению с контролем путем вычисления критерия Стьюдента-Фишера. При $P < 0,05$ различия средних арифметических сравниваемых вариационных рядов считались достоверными.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате исследований установлено, что использование кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью не вызвало изменений в клиническом статусе и этологии крыс. Гибели лабораторных животных в ходе эксперимента не выявлено.

Подопытные животные хорошо потребляли и переносили кормовую добавку, они были клинически здоровы в течение всего эксперимента, не отмечалось нарушений в поведении, приеме корма и воды, аналогично контрольным животным.

На протяжении опыта животные всех групп имели хорошую упитанность и удовлетворительное общее состояние. Подопытные животные были подвижны и активны, шерстный покров был гладким и отличался характерным блеском.

При патологоанатомическом изучении внутренних органов животных изменений в их структуре не выявлено. Внутренние органы располагались анатомически правильно, жидкость в плевральной и брюшной полостях отсутствовала. Просвет трахеи и бронхов свободен, ткань легких имела розовый цвет. Слизистая оболочка, выстилаящая желудок и кишечник после использования экспериментального образца кормовой добавки на основе спорообразующих бактерий, была без видимых изъязвлений и кровоизлияний, серо-розового цвета. Печень, поджелудочная железа, почки, сердце подопытных животных были в норме, как и у контрольных животных.

В таблице 2 приведены результаты изучения интенсивности роста лабораторных животных в период опыта.

Анализ данных таблицы 2 свидетельствует о том, что скармливание лабораторным животным кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью способствовало увеличению массы тела на 9,7 % ($P < 0,05$) в сравнении с животными контрольной группы, что указывает на более интенсивное протекание обменных процессов в организме.

Таблица 2 – Масса тела подопытных крыс в период опыта, г (M ± m)

Группы	Масса тела, г	
	В начале опыта	В конце опыта
Контрольная	149,91 ± 3,79	174,31 ± 5,35
Опытная	153,48 ± 3,55	191,31 ± 6,83*

Для оценки метаболической активности в организме животных принято использовать размеры таких внутренних органов, как сердце, почки и печень, функции которых непосредственно связаны с обменом веществ и энергии в организме. Зависимость веса внутренних органов от веса тела настолько устойчива, что называется правилом величины. Учет влияния данного правила считается обязательным при оценке адаптационных реакций.

В ходе исследований установлено, что использование кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью не оказало существенного влияния на весовые показатели внутренних органов экспериментальных животных (таблица 3).

Таблица 3 – Масса некоторых внутренних органов крыс, г (M ± m)

Группы жи- вотных	Показатели				
	Масса сердца	Масса легких	Масса печени	Масса почек	Масса селезенки
Контрольная	0,80 ± 0,06	1,82 ± 0,22	8,87 ± 0,37	1,75 ± 0,08	1,26 ± 0,10
Опытная	0,82 ± 0,03	1,95 ± 0,21	9,14 ± 0,58	1,81 ± 0,06	1,23 ± 0,18

При этом более высокая масса отдельных органов у животных опытной группы в сравнении с контрольной группой может объясняться более высокой массой самих животных. В этой связи более точным критерием оценки влияния кормовой добавки на весовые показатели некоторых внутренних органов является сравнительный анализ их индексов. Сравнительный анализ индексов внутренних органов экспериментальных животных выявил уменьшение индексов печени и почек у крыс опытной группы по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы, что также указывает на более интенсивное течение метаболических процессов (таблица 4).

Таблица 4 – Индексы внутренних органов лабораторных животных, % (M ± m)

Группы животных	Показатели				
	Индекс сердца	Индекс печени	Индекс почек	Индекс легких	Индекс селезенки
Контрольная	0,45 ± 0,09	5,09 ± 0,29	1,01 ± 0,10	1,03 ± 0,06	0,72 ± 0,05
Опытная	0,42 ± 0,07	4,80 ± 0,49	0,94 ± 0,09	1,07 ± 0,07	0,58 ± 0,06

Известно, что при высоком уровне обмена веществ животные имеют меньшие энергетические резервы в печени и относительно

меньшую массу этого органа. Кроме того, индекс печени отражает ее функцию накопления быстро мобилизуемых питательных веществ.

Результаты биохимических исследований сыворотки крови показали (таблица 5), что у животных, получавших кормовую добавку на основе пробиотических бактерий, с α -галактозидазной активностью было отмечено увеличение общего белка (в пределах физиологической нормы) в сравнении с контролем 4,9 %, что может свидетельствовать об оптимизации белкового обмена. Следует отметить, что уровень альбуминовой фракции также был выше у животных опытной группы, следовательно, рост общего белка происходил за счет синтеза его в печени. Разница между группами экспериментальных животных также была обнаружена по такому показателю, как концентрация глобулинов. Их количество было достоверно выше в сыворотке крови крыс опытной группы, в сравнении с контрольными, – на 9,6 %. Глобулины выполняют иммунную функцию (антитела), обеспечивают нормальное свертывание крови, а также представлены ферментами, гормонами и белками-переносчиками разнообразных биохимических соединений. Усиление синтеза глобулинов может происходить при наличии воспалительного процесса после тканевых повреждений и/или в ответ на чужеродные антигены. У экспериментальных животных подобного явления не установлено, т. к. соотношение А/Г-фракции в пределах референтной величины, что свидетельствует о стимулирующем воздействии кормовой добавки на гуморальный иммунитет. Кроме того, данные изменения могут свидетельствовать об активизации метаболизма белка и повышении естественной резистентности животных.

Об интенсивности белкового метаболизма у животных можно судить по содержанию конечного продукта расхода азотистых веществ – мочевины.

Таблица 5 – Результаты биохимического исследования сыворотки крови крыс, ($M \pm m$)

Показатели	Группа животных	
	Контрольная	Опытная
1	2	3
Общий белок, г/л	57,22 ± 1,83	60,08 ± 1,08
Альбумины, г/л	33,68 ± 1,43	34,33 ± 1,64
Глобулины, г/л	22,85 ± 1,12	25,05 ± 1,86
А/Г, ед.	1,47 ± 0,15	1,37 ± 0,18
Са, ммоль/л	1,83 ± 0,09	1,97 ± 0,08
Р, ммоль/л	1,67 ± 0,14	1,64 ± 0,12
Железо, мкмоль/л	95,08 ± 7,16	100,22 ± 8,70
Амилаза, ед./л	465,50 ± 13,00	478,17 ± 12,73
Креатинин, мкмоль/л	99,83 ± 7,98	76,03 ± 5,36*
Глюкоза, ммоль/л	5,20 ± 0,49	4,83 ± 0,39

Продолжение таблицы 5

1	2	3
Холестерин, ммоль/л	2,25 ± 0,12	2,17 ± 0,09
АлАТ, ед./л	156,83 ± 13,21	144,02 ± 7,18
АсАТ, ед./л	136,10 ± 9,45	131,83 ± 5,70
Билирубин, мкмоль/л	8,38 ± 0,44	7,10 ± 0,47*
Магний, ммоль/л	0,85 ± 0,05	0,88 ± 0,04
Мочевина, ммоль/л	4,98 ± 0,18	4,17 ± 0,25*
Щелочная фосфатаза, ед./л	215,33 ± 21,25	185,33 ± 17,35*

У животных опытной группы данный показатель был ниже, чем в контроле, на 19,4 % ($P < 0,05$), что свидетельствует о более эффективном использовании азота, поступающего с кормом. Наряду с мочевиной важным клинико-диагностическим показателем небелкового азотистого обмена является креатинин. Повышение креатинина в сыворотке крови указывает на нарушение работы почечного фильтра и является показателем почечной недостаточности. Однако в наших исследованиях данный показатель находился в пределах физиологической нормы у всех подопытных животных, а у крыс, получавших кормовую добавку, он был ниже, чем в контроле, что свидетельствует о нормальной работе почек (способности выводить продукты азотистого обмена).

Вместе с активизацией белкового метаболизма у животных, получавших кормовую добавку, отмечена активизация и минерального обмена. Так, концентрация кальция у животных опытной группы была выше, чем в контроле, на 7,6 %. Что касается фосфора, то достоверных различий по его содержанию между группами установлено не было. Концентрация магния также возросла у животных, получавших кормовую добавку, однако достоверных различий с контролем не наблюдались. Выпаивание животным опытной группы кормовой добавки способствовало повышению концентрации железа в сыворотке крови на 5,14 ммоль/л, или на 5,4 %, в сравнении с контролем, что объясняется повышением концентрации гемоглобина у животных опытной группы и может указывать на активизацию окислительно-восстановительных реакций организма.

Необходимо отметить тенденцию к снижению концентрации холестерина у животных опытной группы в сравнении с контролем, что может свидетельствовать об активизации липидного обмена, однако достоверных различий по этому показателю между группами не отмечалось.

Концентрация ферментов, являющихся показателем состояния печени, свидетельствует о том, что кормовая добавка на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью не оказывают негативного воздействия на функции данного органа. Паренхиматозные поражения печени сопровождаются увеличением активности ферментов

аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ). В наших исследованиях активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) у животных обеих групп была в пределах физиологической нормы, но в опытной группе, получавшей кормовую добавку, она была несколько ниже, чем в контрольной группе, однако достоверных различий по этому показателю не наблюдалось. Что касается активности аланинаминотрансферазы (АлАТ), то у животных, получавших кормовую добавку, она была ниже, чем в контроле, на 8,9 %.

Что касается щелочной фосфатазы (содержится во всех органах и тканях животных, особенно много ее в костной ткани, печени, почках; показывает состояние костной ткани), то активность ее в сыворотке крови животных всех групп находилась в пределах физиологической нормы. У крыс, получавших кормовую добавку, активность щелочной фосфатазы была ниже, чем в контроле, на 16,1 % ($P < 0,05$), что может свидетельствовать о нормальном функционировании остеобластов и, как следствие, нормальном состоянии костной ткани.

Важным показателем, характеризующим функциональное состояние печени, является содержание билирубина. Необходимо отметить, что у животных обеих групп данный показатель находился в пределах физиологической нормы и составлял 8,38 мкмоль/л в контроле и 7,10 мкмоль/л в опытной группе, что указывает на нормальное функциональное состояние печени (дезаминирующей функции).

Положительное влияние кормовой добавки на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью на организм крыс подтверждается и гематологическими показателями. Так, было отмечено повышение (в пределах физиологической нормы) концентрации эритроцитов на 7,8 % в сравнении с контролем (таблица 6). Вместе с увеличением концентрации эритроцитов возросло содержание гемоглобина в крови животных опытной группы, однако достоверных различий по данному показателю в сравнении с контролем не наблюдалось. Данные изменения указывают на качественное улучшение состава крови: выше содержание эритроцитов, в эритроцитах содержится больше гемоглобина, что способствует лучшему переносу кислорода к тканям и органам.

Таблица 6 – Гематологические показатели подопытных животных, ($M \pm m$)

Показатели	Группа животных	
	Контрольная	Опытная
Эритроциты, $10^{12}/л$	$5,75 \pm 0,16$	$6,20 \pm 0,21$
Лейкоциты, $10^9/л$	$14,78 \pm 0,71$	$13,30 \pm 0,37$
Тромбоциты, $10^9/л$	$323,83 \pm 25,80$	$320,33 \pm 15,72$
Гемоглобин, г/л	$134,00 \pm 3,75$	$142,33 \pm 3,63$
Гематокрит, %	$36,13 \pm 1,29$	$35,83 \pm 1,14$

Что касается лейкоцитов, то количество их снизилось у животных опытной группы на 11,1 % (в пределах физиологической нормы) в сравнении с контролем, что может свидетельствовать об отсутствии воспалительных процессов и формировании клеточных факторов специфической защиты организма, однако достоверных различий по этому показателю между животными обеих групп не наблюдалось. Концентрация тромбоцитов колебалась от $320,33 \times 10^9/\text{л}$ в опытной группе до $323,83 \times 10^9/\text{л}$ в контроле, что соответствует физиологической норме животных.

Известно, что при нарушении метаболизма и дисбактериозе гематокритное число понижается, т. к. происходит нарушение соотношения в крови форменных элементов и воды, особенно в период дегидратации. Результаты исследований показали, что гематокритная величина у животных всех групп находилась в пределах физиологической нормы.

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований в условиях *in vivo* свидетельствуют о том, что кормовая добавка на основе пробиотических бактерий с α -галактозидазной активностью способствует активизации гемопоэза и окислительно-восстановительных реакций организма, что выразилось в повышении концентрации эритроцитов на 7,8 % и гемоглобина на 6,2 % в сравнении с контролем, повышении неспецифической и специфической защиты организма, нормализации функционального состояния печени (дезаминирующей функции) и почек (способности выводить продукты азотистого обмена), что выразилось в снижении концентрации в сыворотке крови креатинина на 31,3 % и мочевины на 19,4 %, а также стимуляции роста и развития животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эффективность применения в птицеводстве кормовых добавок различного механизма действия: рекомендации производству / М. А. Гласкович [и др.]. – Горки: БГСХА, 2019. – 89 с.
2. Косолапов, В. М. Роль кормовых зернобобовых культур в укреплении кормовой базы животноводства / В. М. Косолапов, И. А. Трофимов // Научно-производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». – 2012. – № 1. – С. 98-101.
3. Новый ферментный препарат в рационе молодняка свиней / Н. Ниязов [и др.] // Комбикорма. – 2019. – № 4. – С. 64-67.
4. Тараканов, Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организма животных / Б. В. Тараканов // Ветеринария. – 2000. – № 1. – С. 47-54.