

СТИМУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ КРОЛЬЧАТ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ МЯГКИХ ФЕКАЛИЙ МАТЕРИ

© 2008 г. Н. А. Ушакова, Е. В. Федосов, А. А. Козлова, Е. В. Котенкова

Представлено академиком Э.И. Воробьевой 21.03.2008 г.

Поступило 21.03.2008 г.

Ответы на вопросы взаимодействия матери и детенышей на разных стадиях онтогенеза имеют существенное значение для понимания механизмов формирования видоспецифических и индивидуальных особенностей физиологии и поведения взрослых особей [1]. У грызунов и зайцеобразных эти процессы в период молочного вскармливания хорошо изучены. Препубертатный период исследован в меньшей степени. Показано, что в слепой кишке лактирующих самок крыс *Rattus norvegicus*, иглистых мышей *Acomys sahirinus* синтезируется материнский феромон, который выделяется с фекалиями и является аттрактантом для детенышей [2–4]. Феромон появляется у самок, когда их потомки переходят от чисто молочной на смешанную диету, и прекращает синтезироваться к окончанию периода выкармливания. Полагают, что поедание помета с материнским феромоном предотвращает у детенышей некротический энтероколит [5]. В состав активной фракции феромона входит дезоксиголевая кислота, которая может образовываться в процессе дегидроксилирования и деконъюгирования холевой кислоты с помощью кишечных бактерий *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp.

После перехода крольчат на самостоятельное питание присутствие крольчихи-матери оказывает стимулирующее воздействие на их развитие [6, 7]. Показано, что при содержании с самкой до трех месяцев крольчата карликовых кроликов набирают массу тела быстрее, чем контрольные (без матери) [8]. Однако механизмы влияния матери на рост детенышей не выявлены. Нами высказано предположение, что одним из стимулирующих влияний крольчихи является попадание мягкого помета матери, содержащего полезные микросимбионты, в кишечный тракт крольчат. Взрослые кролики поедают собственный мягкий помет, в состав которого входит биомасса кишеч-

ных бактерий, протеины, органические кислоты [9–11]. Лишение животного возможности копрофагии мягкого помета оказывает отрицательное влияние на физиологическое состояние организма [12].

Цель исследований – изучение механизмов влияния матери на рост и развитие крольчат в препубертатный период, исследование возможности попадания бактерий мягкого кала матери в организм крольчат, выделение из мягкого помета лактирующей крольчихи симбионтных микроорганизмов и изучение их влияния на рост детенышей.

В экспериментах использовали карликовых кроликов породы цветной карлик. Крольчат содержали в стандартных клетках (50 × 50 × 40 см) группами по три особи. Состав групп подбирали таким образом, чтобы различия в массе тела сохранившихся вместе крольчат были минимальны. Для всех кроликов был стандартный рацион. Состав корма: сено (преимущественно злаковое), зерно (овес), хлопья овсяные (геркулес), овощи (морковь, капуста, яблоки и др.), хлеб, минеральная подкормка (фосфат кальция, хлорид натрия).

Для двух групп крольчат в возрасте 2 мес. проведены непрерывные наблюдения за поведением в течение 24 ч. В каждой клетке находилась керамическая плитка, на которую до начала опыта помещали 5 г свежесобранного мягкого кала лактирующей самки. Фиксировали все контакты крольчат с мягким калом в течение периода наблюдений.

Из свежесобранных мягких фекалий лактирующей крольчихи выделили и получили в чистом виде культуру энтерококка. Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки микроорганизма определяли стандартными методами общей бактериологии [13]. Идентификацию осуществляли по данным филогенетического анализа на основании секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. Возможность пробиотических свойств штамма оценивали по способности клеток к росту в присутствии

4%-ного NaCl, 40%-ной желчи, при щелочном pH, 40%-ного трипсина.

Влияние на рост и развитие крольчат добавления в корм выделенного микроорганизма исследовали по оригинальной методике. Для этого 2-суточную культуру бактерий в 0.5%-ном молоке наносили на поверхность овсяных хлопьев “Геркулес” (ГОСТ 21149–93) распылением в количестве 100–200 мл культуры на 1000 г хлопьев и мягко высушивали. Жизнеспособность клеток сохранялась в течение 15 сут, поэтому через каждые две недели готовили свежий препарат. Полученный “биогеркулес” вводили в рацион крольчат. Были сформированы две группы: опытная, $n = 6$, крольчат содержали до 1-месячного возраста с матерью, потом до трех месяцев без матери, с введением в рацион “биогеркулеса”; контрольная, $n = 5$, их содержали до 1-месячного возраста с матерью, потом до трех месяцев без матери с введением в рацион геркулеса без бактерий в таком же количестве, как и в опытной группе. Остальные условия содержания кроликов были идентичными. Динамику живой массы тела контролировали взвешиванием крольчат 1 раз в 6 дней. Результаты опытов обрабатывали с помощью критерия Манна–Уитни в программе Statistica, а также в программе MS Excel. Химические показатели бедренных мышц оценивали стандартными методами [14].

В ходе наблюдений получено подтверждение того факта, что крольчата активно контактируют с мягким калом матери и он может попадать в кишечный тракт детенышей. В течение суток крольчата обнюхивали, наступали, топтались по калу и т.д. Всего зарегистрировано 192 контакта с подложенным в клетку мягким калом. Показано, что мягкий кал неоднократно соприкасался с кормом (зерном, хлебом). Такой корм с частицами мягких фекалий затем поедался крольчатами. Кроме того, детеныши вылизывали лапы с остатками мягкого кала матери. Копрофагии мягкого помета лактирующей самки не наблюдали; была зарегистрирована только копрофагия собственного помета из ануса. Мягкий кал матери не обладал вкусовой привлекательностью для крольчат. Копрофагия как поведенческий акт, по-видимому, появлялась у детенышей в результате импринтинга и подражания элементам поведения матери.

Из мягких фекалий лактирующей крольчихи выделен непатогенный штамм молочнокислых бактерий, идентифицированный как *Enterococcus faecalis*. Устойчивость клеток к 4%-ной NaCl, 40%-ной желчи, 40%-ному трипсину, pH 9.5 свидетельствовала о возможности использования штамма в качестве пробиотика. Это подтвердили данные по увеличению массы тела детенышей при опытном введении живых клеток *E. faecalis* в

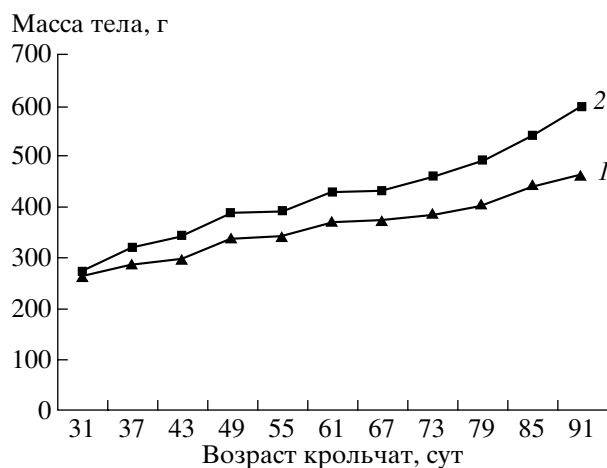


Рис. 1. Динамика живой массы тела крольчат. 1 – контрольная группа; 2 – опытная группа, на рационе с *E. faecalis*.

рацион крольчат (рис. 1). Масса тела крольчат по окончании опыта составила: в контрольной группе 463 ± 85 г; в группе, получавшей бактериальную добавку, 595 ± 120 г, что составило 128.5% по отношению к массе тела крольчат из контрольной группы ($P = 0.082251 > 0.05$). Средний привес массы тела за весь период опыта: в контрольной группе 198 ± 72 г; в экспериментальной 323 ± 95 г по отношению к контролю ($P = 0.030303 < 0.05$); средний недельный привес в контрольной группе 20 ± 7 г, в экспериментальной 39 ± 9 г по отношению к контролю ($P = 0.030303 < 0.05$). Таким образом, для двух показателей различия оказались достоверны, а для массы тела по окончании опыта можно отметить ярко выраженную тенденцию к ее большим значениям у крольчат из опытной группы.

В работе впервые показано, что в мягком помете крольчихи-матери содержатся микроорганизмы, обладающие пробиотическими свойствами для детенышей. Введение в рацион крольчат материнских бактерий *E. faecalis* привело к ускоренному росту молодняка. Действие пробиотика проявилось в стимуляции протеинового и липидного обменов веществ у опытных крольчат, на

Таблица 1. Химический состав ткани мышц бедра крольчат на рационе с *E. faecalis* и в контрольной группе, %

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа
Влага	76.80	76.44
Протеин	81.13	83.13
Липиды	4.98	6.01
Зола	5.27	5.03

что указывает химический анализ бедренных мышц (табл. 1).

Становление кишечного микробиоценоза в препубертатный период представляет собой важный этап в развитии крольчат, в котором принимает активное участие мать посредством контактной передачи пробиотических симбионтов мягких фекалий. Данные подтверждают важность содержания детенышей в течение этого периода с матерью как источника необходимых симбионтов и свидетельствуют о возможности компенсации, до некоторой степени, положительного влияния матери с помощью искусственных пробиотических препаратов. Зоологические наблюдения являются основой для эффективного выделения бактерий, обладающих пробиотическими свойствами.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра "Биоинженерия" РАН Т.П. Туровой и Т.В. Колгановой и за секвенирование последовательностей гена 16S рРНК энтерококка и филогенетический анализ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 07-04-00700-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крученкова Е.П. Принципы отношений мать-детеныш у млекопитающих. Автореф. д-ра биол. наук. М.: МГУ, 2002. С. 1-50.
2. Leon M. // *Physiol. and Behav.* 1974. V. 13. P. 441-453.
3. Porter R.H., Doane H.M. // *Physiol. and Behav.* 1976. V. 16. P. 75-78.
4. Kilpatrick S.J., Bolt M., Moltz H. // *Physiol. and Behav.* 1980. V. 25. P. 31-34.
5. Moltz H., Kilpatrick S.J. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1978. V. 2. № 4. P. 277-280.
6. Михайлов И.Н. Что нужно кролику. Л.: Сталкер, 1991. 99 с.
7. Михайлов И.Н. Методика акселерационного кролиководства. СПб.: Гидрометеиздат, 2003. 270 с.
8. Федосов Е.В., Соктин А.А. Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2006. С. 297-301.
9. Калугин Ю.Ф. Физиология питания кроликов. М.: Колос, 1980. 173 с.
10. Vernay M. // *Reprod. Nutr. Develop.* 1986. V. 26. № 5A. P. 1137-1149.
11. Gidenne T. // *Livestock Production Sci.* 1997. V. 51. № 1. P. 73-88.
12. Detaux G., Gallouin F., Guemon L., Papantonakis C. // *Reprod. Nutr. Develop.* 1980. V. 20. № 5B. P. 1651-1659.
13. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983. Т. 1. 535 с.
14. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. М.: Россельхозиздат, 1976. 360 с.