**Влияние пробиотического штамма Bacillus subtilis на признаки заболеваний желудочно-кишечного тракта телят молочного скотоводства**

***Грибченко И. Б.1,2, Калмыкова Г. В.1, Акулова Н. И. 1, Саеиди А.3, Бец В.Д. 1***

*1 - Новосибирский Государственный Технический Университет, Центр технологического превосходства, Новосибирск, Россия; 2 - Новосибирский Государственный Аграрный Университет, Институт ветеринарной медицины и биотехнологии, Новосибирск, Россия, E-mail: eleavelens01@mail.ru; 3 - Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия*

Развитие неонатальной диареи у телят является серьезной проблемой и приносит большие экономические потери для скотоводства. Причины развития патологии бывают как инфекционного, так и не инфекционного характера.

Важным фактором контроля за состоянием желудочно-кишечного тракту у телят является диагностика патогенов и применение, с целью профилактики и лечения, про- и пребиотических препаратов [1,2]. Пробиотики оказывают положительный эффект за счет конкуренции с патогенной микрофлорой за возможность адгезии на эпителиальных клетках кишечника, а также пробиотические штаммы в процессе жизнедеятельности могут выделять токсины, подавляющие рост патогенов и, участвуя в метаболизме, способствуют разрастанию нормофлоры [3].

Перспективы применения пробиотиков в качестве терапии воспаления кишечника, очевидны на фоне растущих проблем антибиотикорезистентности патогенной микрофлоры. *Bacillus subtilis* считается безопасным пробиотиком и давно применяется в молочном и мясном скотоводстве, в качестве добавки к рациону [4].

В данном исследовании мы оценивали влияние пробиотического штамма *Bacillus subtilis Bs20* на проявление диареей заболеваний желудочно-кишечного тракта у телят молочного скота Сибири в условиях хозяйства Новосибирской области, России. А также оценивали скорость элиминации пробиотического штамма из организма телят, при скармливании им жидкой формы пробиотика.

В эксперименте участвовали телята черно-пестрой породы приобского типа, разного пола, 2х-месячного возраста. У животных наблюдались признаки диареи различной степени тяжести (вялость, снижение аппетита, диарея 3 балла – жидкая консистенция). В ходе сбора анамнеза было установлено, что развитию диареи способствовала неправильная выпойка молока, возможное однократное скармливание не свежего молока и скученное содержание животных.

Для проведения эксперимента определили две группы животных:

1. Опытная группа состояла из 5 телят 2х-месячного возраста, которым каждый день, утром с молоком задавался препарат в виде белой суспензии в объёме 50 мл на голову. Препарат применялся 12 дней.
2. Контрольная группа из 5 телят 2х-месячного возраста, где препарат не применялся.

Нами были собраны образцы фекалий до начала эксперимента, на 1-й, 3-й, 14-й день после отмены препарата.

Для определения степени диареи использовалась бальная оценка фекальной консистенции. Такая оценка впервые упомянута Larson et al. Она основана на текучести, где 1 балл считается нормальным, 2 балла — мягкий, 3 — жидкий и 4 — водянистый [5].

Титр спор определяли высевом 100 мкл соответствующего десятикратного разведения на агаризованную картофельную среду с канамицином. Чашки помещали в термостат при 37 0С в течение 24 ч, после чего производили подсчет колоний с дальнейшим расчётом колониеобразующих единиц в исходном образце.

Для изучения видового разнообразия культур микроорганизмов производили пересев колоний с посевов образцов 0 и 14 суток на среду CHROMagar Orientation (Chromagar, France). После пересева инкубировали чашки в аэробных условиях при 37 °C в течение 24 часов.

Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics (версия 23). Для анализа данных с ненормальным распределением использовались непараметрические методы статистической обработки. Эффект суток определяли с помощью непараметрического аналога однофакторного дисперсионного анализа- критерия Краскала-Уоллиса. Сравнение двух групп данных с ненормальным распределением проводили с помощью U критерия Манна — Уитни.

Как известно, пробиотики, в том числе бактерии рода Bacillus, взаимодействуют с нормофлорой кишечника и способны активно участвовать в метаболических процессах [2]. На 3-и сутки после отмены споровой суспензии мы наблюдали достоверное отличие опытной и контрольной групп по баллам консистенции фекалий (Z=2,041; p=0,041). У опытной группы консистенция приблизилась к норме (1 балл), а у контрольной группы оставалась на уровне 2-3 баллов, что говорит о наличии легкой формы диареи. На 14-е сутки после отмены бактериальной суспензии консистенция фекалий у опытной группы вернулась к норме и достоверно отличалась от контрольной группы телят (Z= 2,887; p=0,004). Таким образом можно говорить о влиянии бактерий B. subtillis на метаболизм и развитие диареи. Помимо этого, мы наблюдали закономерное уменьшение титра спор бактерий B. subtillis в фекалиях телят опытной группы. Титры спор достоверно отличались на 1-е сутки после отмены с титром спор на 3-и сутки (Z=2,611; p=0,009), а также с титром спор на 14-е сутки (Z=2,694; p=0,007). Этот эффект является закономерным, поскольку эти бактерии относятся к аллохтонной микрофлоре и надолго не задерживаются в организме [6].

Наличие бактерий B. subtillis в фекалиях подтверждали путем посева на картофельный агар с канамицином. Так до начала эксперимента на чашках мы не наблюдаем роста колоний бактерий B. subtillis. Однако на 1-е сутки после отмены суспензии наблюдается максимальное количество клеток тестируемого штамма в 1 г фекалий, которое соответствует (1,66 +/- 0,5) х106 КОЕ/г. На 3-и сутки после отмены споровой суспензии пробиотических штаммов рода Bacillus отмечено снижение численности бактерий на 2 порядка (3,86 +/- 0,6) х104 КОЕ/г, а на 14-е сутки в фекалиях всех телят кроме одного тестовые споровые бактерии уже не выявились.

В образцах фекалий животных контрольной группы, которым не добавляли в рацион споровую суспензию, бактерии B. subtillis не выявлены на протяжении всего эксперимента.

В ходе эксперимента мы исследовали микробное разнообразие в фекалиях животных опытной группы. Так при посеве на питательную среду CHROMagar Orientation мы наблюдали наличие спор грибов рода Candida у телят до применения споровой суспензии, однако на 14 сутки после отмены препарата спор не детектируется. Это может указывать на фунгицидную активность бактерий B. subtillis. В некоторых работах описана подобная активность [7,8]. Так же можно наблюдать, что на 14 сутки не детектируются бактерии группы KESC (Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter). Эти данные позволяют сделать вывод о влиянии бактерий B. subtillis на микрофлору кишечника.

После применения терапевтической дозы препарата споровой суспензии пробиотических штаммов B. subtillis у животных опытной группы отсутствовали признаки диареи и вялости, а также было отмечено улучшение аппетита. Поскольку на 14й день после отмены препарата в фекалиях почти не определялись споры B. Subtillis, можно предположить, что у жвачных животных в среднем пребывание в просвете кишечника пробиотического штамма Bacillus около двух недель, при условии ежедневного поступления высоких титров бактерий с кормом. В образцах на 14 сутки отмечалось изменение видового разнообразия культур микроорганизмов, по сравнению с образцами до кормления пробиотическими штаммами. Это указывало на изменение микробиоты кишечника после применения споровой суспензии.

**Литература**

1. Ziese, A.L.; Suchodolski, J.S.; Hartmann, K.; Busch, K.; Anderson, A.; Sarwar, F.; Sindern, N.; Unterer, S. Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic Clostridium perfringens in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS One* **2018**, *13*, e0204691, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0204691.

2. Bernardeau, M.; Lehtinen, M.J.; Forssten, S.D.; Nurminen, P. Importance of the gastrointestinal life cycle of Bacillus for probiotic functionality. *J Food Sci Technol* **2017**, *54*, 2570–2584, doi:10.1007/S13197-017-2688-3/FIGURES/1.

3. Hashem, A.; Tabassum, B.; Fathi Abd\_Allah, E. Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J Biol Sci* **2019**, *26*, 1291, doi:10.1016/J.SJBS.2019.05.004.

4. Wang, Q.; Ren, Y.; Cui, Y.; Gao, B.; Zhang, H.; Jiang, Q.; Loor, J.J.; Deng, Z.; Xu, C. Bacillus subtilis Produces Amino Acids to Stimulate Protein Synthesis in Ruminal Tissue Explants via the Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Beta–Serine/Threonine Kinase–Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Pathway. *Front Vet Sci* **2022**, *9*, 691, doi:10.3389/FVETS.2022.852321/BIBTEX.

5. Larson, L.L.; Owen, F.G.; Albright, J.L.; Appleman, R.D.; Lamb, R.C.; Muller, L.D. Guidelines Toward More Uniformity in Measuring and Reporting Calf Experimental Data I. doi:10.3168/jds.S0022-0302(77)83975-1.

6. Morozova, M. V.; Kalmykova, G. V.; Akulova, N.I.; Ites, Y. V.; Korkina, V.I.; Litvinova, E.A. Autoclaved Diet with Inactivated Spores of Bacillus spp. Decreased Reproductive Performance of Muc2−/− and Muc2+/− Mice. *Animals* **2022**, *12*, 2399, doi:10.3390/ANI12182399/S1.

7. El Barnossi, A.; Moussaid, F.; Iraqi Housseini, A. Antifungal activity of Bacillussp. Gn-A11-18isolated from decomposing solid green household waste in water and soil against Candida albicans and Aspergillus niger. *E3S Web of Conferences* **2020**, *150*, 02003, doi:10.1051/E3SCONF/202015002003.

8. Khan, N.; Martínez-Hidalgo, P.; Ice, T.A.; Maymon, M.; Humm, E.A.; Nejat, N.; Sanders, E.R.; Kaplan, D.; Hirsch, A.M. Antifungal activity of bacillus species against fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 2363, doi:10.3389/FMICB.2018.02363/BIBTEX.