

УДК 616.34:598.617.1

**ПРОФІЛАКТИЧНИЙ ТА КОРЕГУЮЧИЙ ВПЛИВ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ
КАРОТИНОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ДРІЖДЖІВ *PHAFFIA RHODOZYMA*
НА ФОРМУВАННЯ МІКРОБОЦЕНОЗУ КИШКІВНИКА КУРЕЙ
ПІД ЧАС КРИТИЧНОГО ПЕРІОДУ ЙОГО СТАНОВЛЕННЯ**

О. М. Стефанишин, Г. І. Нечай, Н. І. Борецька, С. В. Гураль, Н. І. Цепко
inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна

До моменту вилуплення пташенят їх шлунково-кишковий тракт стерильний і заселяється в перші години життя мікроорганізмами навколишнього середовища. Молоді птахи більш чутливі до колонізації патогенними мікроорганізмами саме через несформований мікробіоценоз кишечника. Отже, однією із важливих проблем отримання здорового поголів'я сільськогосподарської птиці є забезпечення швидкого і повноцінного формування складу мікрофлори травного тракту молодняку.

Проведено дослід на 3 групах молодняку курей-несучок кросу «Хайсекс коричневий» у віці 10–60 діб, по 3 голови у групі в умовах віварію Інституту біології тварин НААН. Птиця контрольної групи споживала повнораціонний комбікорм (ПРК), збалансований за поживними і біологічно активними компонентами. Курчатам першої дослідної групи було введено до раціону з 18 доби висушену біомасу дріжджів *P. rhodozyma* (1 % від маси раціону) протягом двох тижнів, а другої дослідної — з 46 доби біомасу дріжджів *P. rhodozyma* (1 % від маси раціону) протягом двох тижнів. Проведено забій 32- та 60-добового молодняку. Проби вмісту сліпої кишки відбирали після забою, переносили у стерильний посуд і досліджували видовий кількісний та якісний склад мікрофлори методом розведень та висіванням мікроорганізмів на селективні середовища.

Ідентифікацію їх проводили за морфологічними, фізіологічними та біохімічними характеристиками.

У статті наведена характеристика складу мікрофлори кишечника молодняку курей-несучок кросу «Хайсекс коричневий» від 10-добового до 60-добового віку при згодовуванні біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*.

Для профілактики та корекції порушень становлення мікробіоценозу кишечника курей пропонується застосовувати біомасу непатогенних каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* в ранньому віці (з 18 доби), коли відбувається становлення шлунково-кишкового тракту курей, в якості пребіотичного препарату. У другому критичному етапі становлення мікробіоценозу кишечника в процесі ювенальної линьки (від 46 до 60 доби життя) пропонуємо застосовувати біомасу непатогенних каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* (у кількості 1 % від маси раціону), в якості пробіотика, протягом двох тижнів.

Ключові слова: МІКРОФЛОРА КИШКІВНИКА, БІФІДОБАКТЕРІЇ, ЛАКТОБАКТЕРІЇ, КИШКОВА ПАЛИЧКА, СЛІПІ КИШКИ, *PHAFFIA RHODOZYMA*, МОЛОДНЯК КУРЕЙ-НЕСУЧОК КРОСУ «ХАЙСЕКС КОРИЧНЕВИЙ»

**PREVENTIVE AND CORRECTIVE ACTION OF FEED ADDITIVE CAROTENE
SYNTHESIZING YEAST *PHAFFIA RHODOZYMA* ON FORMATION OF INTESTINE
MICROBIOCENOSIS OF CHICKEN DURING CRITICAL PERIOD OF ITS FORMATION**

O. M. Stefanyshyn, H. I. Nechay, N. I. Boretska, S. V. Hural, N. I. Tsepko
inenbiol@mail.lviv.ua

Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stus str. 38; Lviv 79034, Ukraine

Phaffia rhodozyma (1 % от массы рациона) в течение двух недель. Проведен забой 32- и 60-суточного молодняка. Пробы содержимого слепой кишки отбирали после забоя, переносили в стерильные сосуды и исследовали видовой количественный и качественный состав микрофлоры методом разведений и высеванием микроорганизмов на селективные среды. Идентификацию их проводили по морфологическим, физиологическим и биохимическим характеристикам.

В статье приведена характеристика состава микрофлоры кишечника молодняка кур-несушек кросса «Хайсекс коричневый» в возрасте 10–60 суток при скармливании биомассы дрожжей *Phaffia rhodozyma*.

Для профилактики и коррекции нарушений становления микробоценозу кишечника кур предлагается применять биомассу непатогенных каротинсинтезирующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* в раннем возрасте (с 18 суток), когда происходит становление микрофлоры желудочно-кишечного тракта птенцов в качестве пробиотического препарата. Во время второго критического этапа становления микробоценоза кишечного тракта (от 46 до 60 суток жизни) мы предлагаем применять биомассу непатогенных каротиносинтезирующих дрожжей *Phaffia rhodozyma* (в количестве 1% от массы рациона), в качестве пробиотика, в течение двух недель.

Ключевые слова: МИКРОФЛОРА КИШЕЧНИКА, БИФИДОБАКТЕРИИ, ЛАКТОБАКТЕРИИ, КИШЕЧНАЯ ПАЛОЧКА, СЛЕПАЯ КИШКА, PHAFFIA RHODOZYMA, МОЛОДНЯК КУР-НЕСУШЕК КРОССА «ХАЙСЕКС КОРИЧНЕВЫЙ»

При утриманні на одній території багаточисельних груп птиці у популяції нагромаджуються і активізуються збудники інфекцій. Відомо, що мікрофлора довкілля впливає на кишковий микробоценоз, особливо, у перші дні життя курчат [1]. У подальшому стан кишкової мікрофлори впливає на обмінні процеси та здоров'я птиці [2]. Під час онтогенетичного розвитку в організмі птиці в процесі ювенальної линьки, статевого дозрівання та у зв'язку з початком яйцекладки виникають

порушення метаболічних процесів, які характеризуються зниженням активності гідролітичних ферментів шлунково-кишкового тракту та функціонального стану мікробіоти сліпих кишків. При порушенні складу мікрофлори кишківника виникає необхідність проводити лікувальні заходи. Для боротьби з патогенними мікроорганізмами використовують антибіотики, які пригнічують розвиток не тільки хвороботворних мікробів, але і нормальну мікрофлору кишечника, що призводить до розвитку дисбактеріозів [3].

Світовий досвід застосування антибіотиків показав, що не слід вживати будь-які профілактичні заходи боротьби з метою вбивати патогенну мікрофлору. За ефективністю дії пробіотики не поступаються деяким антибіотикам і хіміотерапевтичним засобам, причому вони не мають негативного впливу на мікрофлору травного тракту, не забруднюють продукти тваринництва і довкілля, тобто, вони є екологічно чистими.

Попередні наші дослідження показали, що застосування дріжджів за умов дисбактеріозу у щурів позитивно впливає на склад мікрофлори кишечника та метаболізм тварин [4]. Аналіз даних літератури засвідчує, що клітини дріжджів мають складні механізми впливу на мікрофлору кишечника та стан макроорганізму. Отже, для корекції складу микробоценозу молодняка птиці у критичні періоди його становлення можна застосовувати дріжджі, які мають ряд переваг над пробіотиками, до складу яких входять бактерії.

До моменту вилуплення пташенят їх шлунково-кишковий тракт стерильний і заселяється в перші години життя мікроорганізмами навколишнього середовища. Молоді птахи більш чутливі до колонізації патогенними мікроорганізмами саме через несформований микробиоценоз кишечника [5]. Тому однією із важливих проблем отримання здорового поголів'я сільськогосподарської птиці є забезпечення швидкого і повноцінного формування

нормального складу мікрофлори травного тракту молодняку.

З метою правильного становлення та корекції порушень мікрофлори кишечника птиці застосовують два підходи: а) використання пробіотиків — живих мікроорганізмів, найчастіше біфідобактерій та лактобацил; б) використання пребіотиків — речовин, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів кишечника [2, 6].

У зв'язку з цим для профілактики та корекції порушень становлення мікробоценозу кишечника курей було вирішено застосувати біомасу непатогенних каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma*, в ролі пробіотика [7]. Біомаса цих дріжджів містить високий рівень ненасичених жирних кислот, білків і вітамінів. Крім цього, ці дріжджі здатні синтезувати атаксантин — каротиноїд, який володіє сильною антиоксидантною активністю [9], що збільшує потенціал використання біомаси цих дріжджів у формуванні харчових і кормових раціонів.

Матеріали і методи

Для реалізації поставленого завдання проводили досліди на молодняку курей-несучок кросу «Хайсекс коричневий» від 10-добового до 60-добового віку в умовах віварію Інституту біології тварин НААН. Птиця контрольної групи споживала повнораціонний комбікорм (ПРК), збалансований за поживними і біологічно активними компонентами. Курчатам першої дослідної групи було введено до раціону з 18 доби біомасу дріжджів *P. rhodozyma* (1 % від маси раціону) протягом двох тижнів, а другої дослідної — з 46 доби біомасу дріжджів *P. rhodozyma* (1 % від маси раціону) протягом двох тижнів. Утримання птиці було кліткове, з вільним доступом до корму і води. Температурний і світловий режими відповідав рекомендованим нормам.

Проведено забій 32- та 60-добового молодняку курей-несучок кросу «Хайсекс

коричневий» у кількості 3 голів з контрольної та дослідної груп і відібрано вміст сліпих кишок для вивчення видового кількісного складу мікрофлори. Проби вмісту кишок відбирали після забою, перенесли у стерильний посуд і досліджували видовий кількісний та якісний склад мікрофлори методом розведень та висівання мікроорганізмів на елективні середовища. Кількість колонійутворюючих одиниць (КУО) біфідобактерій визначали на середовищі Блаурока, лактобактерій — на середовищі МРС-1, бактерій кишкової палички — на середовищі Ендо, бактерій роду *Proteus* — на МПА за методом Шухевича, дріжджоподібних грибів роду *Candida* — на середовищі Сабуро. Склад мікрофлори визначали за допомогою методу лабораторної діагностики дисбактеріозу за Красноголовцем В. Н. [9]. Для виявлення окремих видів мікроорганізмів вміст кишечника розводили у фізіологічному розчині в 10 разів. З основного розведення готували ряд наступних (1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000). З певних розведень робили посіви по 0,1 мл на середовища Ендо, Плоскирева, Сабуро, вісмут-сульфітний агар, жовтково-сольовий агар. Чашки витримували у термостаті при 37 °С протягом 2–4 діб. Кількість кишкової палички та інших мікроорганізмів у 1 г вмісту визначали за кількістю колоній, які вирости на відповідному поживному середовищі, з перерахунком на кількість посівного матеріалу та ступінь його розведення. Ідентифікацію окремих колоній проводили за біохімічними, фізіологічними, морфологічними та культуральними ознаками, використовуючи середовища Олькеницького, Сімонса та середовище з феніл-аланіном.

Для виявлення анаеробних біфідобактерій проводили засів розведень у модифіковане середовище Блаурока. Культивували протягом 3 діб, готували мазки та фарбували за Грамом. Констатували присутність бактерій у полі зору при певних розведеннях посівного

матеріалу. Ідентифікацію їх проводили за морфологічними, фізіологічними та біохімічними властивостями.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили на ПК за допомогою програми Microsoft Excel.

Результати й обговорення

Досліджено видовий кількісний та якісний склад мікрофлори у зразках вмісту кишкового палички птиці контрольної групи та при згодовуванні біомаси дріжджів. Результати

змін мікробоценозу птиці контрольної групи представлені у таблиці 1. Виявлено, що у складі мікрофлори порожнини сліпих кишок курчат віком 30 діб домінує *Escherichia coli* ($1,3 \times 10^7$ КУО/г). Кількість біфідобактерій у цей період дослідження становить 10^{12} КУО/г, а лактобактерій — лише 10^{10} КУО/г. Щодо дріжджоподібних грибів роду *Candida*, то їх кількість становила $4,6 \times 10^6$ КУО/г, проте бактерій роду *Proteus* кількість менша — 3×10^4 КУО/г.

Таблиця 1

Вікова динаміка змін мікробоценозу у птиці контрольної групи (M±m, n=3)

Мікроорганізми		32 доба	60 доба
<i>Облігатна мікрофлора</i>			
Заг. кількість кишкової палички	КУО/г	$1,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$
Біфідобактерії	КУО/г	1×10^{12}	1×10^{12}
Лактобактерії	КУО/г	1×10^{10}	1×10^{12}
<i>Факультативна мікрофлора</i>			
<i>Proteus</i>	КУО/г	3×10^4	$1,3 \times 10^4$
Гриби роду <i>Candida</i>	КУО/г	$4,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^7$

У 60-добових курочок, на фоні незмінної кількості у вмісті кишечника біфідобактерій, зростає кількість кишкової палички та лактобактерій (відповідно $6,3 \times 10^8$ КУО/г та 10^{12} КУО/г). Слід відмітити, що в цей період дослідження зростає і кількість умовно-патогенних дріжджоподібних грибів, рівень яких досягає $5,3 \times 10^7$ КУО/г, а кількість бактерій роду *Proteus* зменшується в порівнянні до курчат віком 30 діб ($1,3 \times 10^4$ КУО/г).

Відомо, що дріжджі не можуть колонізувати травний тракт тварин, проте проявляють інгібуючий ефект на адгезію патогенних мікроорганізмів [3]. Показано, що при згодовуванні біомаси дріжджів *P. rhodozyma* у птиці в 32-добовому віці (під час ювенальної линьки, табл. 2) збільшується загальна кількість кишкової палички у порівнянні з показником у контрольній групі, що є позитивним явищем. Оскільки відомо [1], що кишкова паличка є представником нормальної флори і її роль дуже важлива, бо цей

мікроорганізм: по-перше, є головним конкурентом умовно-патогенної флори, перешкоджає заселенню кишкової стінки чужорідними мікроорганізмами; по-друге, кишкова паличка забирає з просвіту кишечника кисень, який є токсичним для анаеробів — біфідобактерій і лактобактерій, таким чином, створюються комфортні умови для основних бактерій кишкової флори.

Кількість основних представників мікробоценозу сліпої кишки курей — лактобактерій і біфідобактерій, становила 10^{10} та 10^{12} КУО/г, відповідно, і залишалася незмінною в тварин дослідної групи у порівнянні з показником у контрольній групі. Під час першого критичного періоду становлення мікробоценозу сліпої кишки молодняку курей-несучок у його складі було виявлено представників умовно-патогенної мікрофлори, а саме бактерій роду *Proteus* — у кількості 3×10^4 КУО/г та грибів роду *Candida* — $4,6 \times 10^6$.

Склад мікробіоценозу сліпої кишки курей у критичні періоди його становлення за двоцикрової корекції біомасою каротиносинтезувальних дріжджів (32 доба життя, $M \pm m$, $n=3$)

Мікроорганізми		Групи дослідних тварин (n=3)	
		Контроль	Дослід: повнораціонний комбікорм (ПРК) + біомаса дріжджів <i>P. rhodozyma</i> (1% від маси раціону) протягом двох тижнів з 18 дня життя
<i>Облігатна мікрофлора</i>			
Заг. кількість кишкової палички	КУО/г	$1,3 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$
Біфідобактерії	КУО/г	1×10^{12}	1×10^{12}
Лактобактерії	КУО/г	1×10^{10}	1×10^{10}
<i>Факультативна мікрофлора</i>			
<i>Proteus</i>		3×10^4	$6,3 \times 10^{2*}$
Гриби роду <i>Candida</i>	КУО/г	$4,6 \times 10^9$	6×10^9
Присутність <i>P. rhodozyma</i>	КУО/г	0	$1,5 \times 10^{10}$

Примітка: * — $p < 0,1$ — різниця вірогідна відносно до контролю

У 32-добових курей, яким згодовували раціон з добавкою біомаси каротиносинтезувальних дріжджів, спостерігали зниження кількості клітин протею у мікробіоценозі сліпої кишки курей у 48 раз, проте кількість дріжджів роду *Candida* дещо зростає. Відомо, що шлунково-кишковий тракт птиці — відкрита біологічна система, в яку постійно потрапляє велика кількість різних мікроорганізмів з кормом. Умовно-патогенні клони транзиторної мікрофлори можуть викликати захворювання лише на тлі дисбіотичних порушень. В інших випадках їх клітини виводяться з організму з послідом, або лізують і слугують субстратом для облігатних мікроорганізмів [7].

Слід відзначити, що у вмісті сліпої кишки курей дослідної групи було виявлено життєздатні клітини дріжджів *P. rhodozyma* у кількості $1,5 \times 10^{10}$ КУО/г, це свідчить про неповне засвоєння птицею 32-добового віку біомаси дріжджів, можливо, через незрілість шлунково-кишкового тракту курей і як наслідок, недостатньої кількості ензимів, які б змогли розщепити міцну полісахаридну клітинну стінку дріжджів.

Під час другого критичного періоду становлення мікробіоценозу сліпих кишків курей (60 доба життя), виявлено незначне збільшення загальної кількості кишкової палички у курей дослідної групи (табл. 3) у порівнянні з тваринами контрольної групи. Встановлено, що кількість біфідобактерій у вмісті сліпої кишки курей дослідної та контрольної груп залишалась незмінною з 32-добового віку, протягом 30 днів, й на 60 добу життя становила 10^{12} КУО/г. Кількість лактобактерій у вмісті сліпої кишки курочок контрольної та дослідної груп 60-добового віку зростає на 25 %, порівняно з тваринами контрольної групи 32-добового віку.

Під час другого критичного періоду становлення мікробіоценозу кишкового тракту у вмісті сліпої кишки курей, яким згодовували каротиносинтезувальні дріжджі, дріжджоподібних грибів роду *Candida* та бактерій роду *Proteus* не виявлено, порівняно з контрольною групою тварин. Слід зазначити, що у тварин дослідної групи під час другого критичного періоду становлення мікробіоценозу сліпої кишки життєздатних клітин дріжджів *P. rhodozyma* виявлено не було, це свідчить про повне засвоєння біомаси каротиносинтезувальних дріжджів.

Зміни у мікробіоценозі сліпої кишки курей у другий критичний період його становлення за двотижневої корекції біомасою каротиносинтезувальних дріжджів (60 доба життя, $M \pm m$, $n=3$)

Мікроорганізми		Групи дослідних тварин ($n=3$)	
		Контроль	Дослід: повнораціонний комбікорм (ПРК) + біомаса дріжджів <i>P. rhodozyma</i> (1% від маси раціону) протягом двох тижнів з 46 дня життя
<i>Облігатна мікрофлора</i>			
Заг. кількість кишкової палички	КУО/г	$6,3 \times 10^8$	$6,6 \times 10^8$
Біфідобактерії	КУО/г	1×10^{12}	1×10^{12}
Лактобактерії	КУО/г	1×10^{12}	1×10^{12}
<i>Факультативна мікрофлора</i>			
<i>Proteus</i>	КУО/г	$1,3 \times 10^4$	не виявлено
Гриби роду <i>Candida</i>	КУО/г	$5,3 \times 10^7$	не виявлено
Присутність <i>P. rhodozyma</i>	КУО/г	0	0

Висновки

Для профілактики та корекції порушень становлення мікробіоценозу кишечника курей пропонується застосовувати біомасу непатогенних каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* в ранньому віці (з 18 доби), коли відбувається становлення шлунково-кишкового тракту курей, в якості пребіотичного препарату. Під час другого критичного етапу становлення мікробіоценозу кишечника (від 46 до 60 доби життя) пропонуємо застосовувати біомасу непатогенних каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* (у кількості 1 % від маси раціону), в якості пробіотика, протягом двох тижнів.

Перспективи подальших досліджень. Застосування пробіотиків у годівлі птиці необхідне і економічно обґрунтоване саме через порушення оптимального складу мікрофлори кишечника при застосуванні антибіотиків, вакцинації, зміні складу раціону та дії інших чинників. Подальші роботи будуть спрямовані на створення нових пробіотиків на основі дріжджів, які б не викликали негативних явищ, встановлених у представленій роботі, а забезпечували здоров'я та повноцінне живлення птиці.

1. Gibson G. R. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 1995, № 125, p. 1401–1412.

2. Jyonouchi H., Zhang L., Gross M., Tomita Y. Immunomodulating actions of carotenoids: Enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T- dependent antigens. *Nutr. Cancer*, 1994, v. 21, p. 47–58.

3. Rolfe R. D. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Rev Infect Dis.*, 1984, v. 6, suppl 1, p. 73–79.

4. Kaminska M. V. Zminy u vydovomu skladi mikrobotsenozu kyshechnyka shehuriv pry zhodovuvanni biomasy drizhdzhiv *Sacharomyces cerevisiae* ta *Phaffia rhodozyma* [Changes of the species composition of the rats large intestines microocenosis under yeast biomass feeding]. *Biolojiya tvaryn — The Animal Biology*, 2007, vol. 9, no. 1–2, pp. 199–202 (in Ukrainian).

5. Dekich M. A. Overview of enteric diseases field problems in chickens. Enteric Disease Control Symposium, AAAP 39th Annual Meeting, Louisville KY, 1996.

6. Takahashi K., Watanabe M., Takimoto T., Akiba Y. Uptake and distribution of astaxanthin in several tissues and plasma lipoproteins in male broiler chickens fed a yeast (*Phaffia rhodozyma*) with a high concentration of astaxanthin. *Br Poult Sci.*, 2004, Feb, vol. 45 (1), p. 133–138.

7. Ahmad I. Effect of probiotics on broilers performance. *J. Poult. Sci.*, 2006, 5 (6), p. 593–597.

8. Meyer P. S., du Preez J. C., Kilian S. G. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, vol. 9, p. 514–520.

9. Krasnogolovez V. N. Disbakterioz kyshechnyka [The intestinal disbacteriosis]. Moscow, Medicine Publ., 1989. 208 p. (In Russian).