

Нетрадиционные рационы и микробиом

УДК 636.52/.58:636.084.416:579.6

doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.280rus

**ЗАМЕЩЕНИЕ КОРМОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В РАЦИОНАХ.
Сообщение I. МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА И ПРОДУКТИВНОСТЬ
МЯСНЫХ КУР (*Gallus gallus* L.) НА ФОНЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТА
С ФИТО- И ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ*****И.А. ЕГОРОВ¹, Т.Н. ЛЕНКОВА¹, В.А. МАНУКЯН¹, Т.А. ЕГОРОВА¹,
И.Н. НИКОНОВ¹, Л.А. ИЛЬИНА², Г.Ю. ЛАПТЕВ²**

Согласно современным мировым тенденциям, в кормлении сельскохозяйственных животных, в том числе птицы, предпочтение отдается использованию пробиотиков и фитобиотиков (эфирные масла) вместо антибиотиков. Эфирные масла обладают антиоксидантными свойствами, антимикробной активностью в отношении патогенов, повышают усвоение питательных веществ корма. Целью настоящей работы была оценка влияния комплексного препарата, состоящего из сорбента, эфирных масел и пробиотических штаммов бактерий, на живую массу, развитие репродуктивных органов, переваримость и использование питательных веществ корма, а также состав микробиома в кишечнике мясных кур. Исследования проводили на двух исходных линиях мясных кур (*Gallus gallus* L.): Б5 (порода корниш) и Б9 (порода плимутрок) (линии получены в Селекционно-генетическом центре «Смена», Московская обл.). Зоотехнический и физиологический опыты проводили в условиях СГЦ «Загорское ЭПХ» (г. Сергиев Посад, Московская обл.) в 2017 году. С 1-суточного до 21-недельного возраста птицу содержали в специальных клетках по 50 гол. в группе. Для эксперимента отбирали молодняк обеих линий, который делили на петушков и курочек. До 1-недельного возраста птица всех групп потребляла комбикорма из растительных компонентов вволю, со 2-й нед выращивания ежедневное количество корма ограничивали. Контрольная группа получала комбикорма растительного типа, сбалансированные по всем питательным веществам в соответствии с возрастными периодами с добавкой кормового антибиотика Бацитрацин-30 (активность 42 ед/мг) в количестве 100 г/т на протяжении всего периода выращивания. Птица опытной группы вместо кормового антибиотика получала комплексный энтеросорбент Заслон 2+ (ТУ 9291-028-50932298-2016 от 18.11.2016, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург) в количестве 1000 г/т корма. Заслон 2+ обладает полифункциональными свойствами, которые обусловлены адсорбционными характеристиками диатомита и биологически активными свойствами эфирных масел тимьяна, лимона, чеснока, шалфея. Кроме того, в его составе присутствует штамм бактерии *Bacillus* sp. В 4- и 7-недельном возрасте птицы проводили физиологический (балансовый) опыт для изучения переваримости и использования питательных веществ корма. В 21-недельном возрасте изучали развитие репродуктивных органов. Состав микрофлоры слепых отростков кишечника исследовали методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). Установлено, что живая масса петушков и курочек обеих линий в 21-недельном возрасте не имела различий с контролем и составила для линии Б5 3168 и 2317 г против 3171 и 2307 г в контрольной группе, для линии Б9 — 2592 и 1930 г против 2574 и 1924 г. Не отмечено существенных различий с контролем по массе репродуктивных органов самцов (семенники) и самок (яичники и яйцеводы). Переваримость и использование питательных веществ корма птицей из опытных групп не имели значительных различий с контролем. При этом петушки и курочки линии Б5 переваривали сухое вещество корма на 4,14 %, жир — на 3,12 % и использовали азот на 3,04 % лучше, чем птица линии Б9. В составе микрофлоры 12-перстной кишки молодняка выявили от 18 до 110 флотипов бактерий (с достоверными различиями по ряду групп относительно контроля, $p \leq 0,05$). Расчет индексов выявил таксономическое разнообразие и сложность организации микробных сообществ в контрольных группах птицы обеих линий. Количество неидентифицированных бактерий в опытных группах было выше. В результате введения в рацион птицы линии Б9 препарата Заслон 2+ в 12-перстной кишке увеличилась численность бактерий семейства *Bacillaceae* и целлюлолитических бактерий семейства *Clostridiaceae*, а у птицы линии Б5 — численность бактерий рода *Bifidobacterium* и порядка *Bacteroidales*, а также снизилось содержание бактерий рода *Campylobacter*. Возрастание численности бактерий данных групп и снижение доли патогенных микроорганизмов может указывать на коррекцию дисбиотических нарушений в кишечнике птиц.

Ключевые слова: исходные линии, мясные куры, кормовой антибиотик, живая масса,

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ для реализации научного проекта 16-16-04089 «Изучение физиологических и микробиологических особенностей пищеварения кур мясных пород в эмбриональный и постэмбриональный периоды для создания новых технологий кормления, обеспечивающих максимально полную реализацию генетического потенциала птицы».

микрофлора кишечника, фитобиотики, энтеросорбент.

Задача обеспечения продуктами питания, в частности высокоценным диетическим мясом, решается на базе расширенного производства бройлеров, которое во всех странах мира основывается на использовании высокопродуктивной птицы различных кроссов. Генетический потенциал продуктивности бройлеров достаточно высок: среднесуточные приросты составляют 60-70 г, затраты корма на 1 кг живой массы — 1,4-1,8 кг, сохранность поголовья за период выращивания — 97-98 %. Максимальная реализация генетического потенциала в условиях производства зависит от норм и режимов кормления, содержания бройлеров, а также от качества племенной птицы, исходных линий (1, 2).

Макроорганизм и его микрофлора представляют единую экологическую систему, находящуюся в состоянии динамического равновесия. Микроорганизмы участвуют в метаболических процессах, поэтому состав микробиома организма относительно постоянен. Между тем на микробиоту, колонизирующую пищеварительный тракт птицы, влияют такие факторы, как возраст, состав кормов, антибиотики, микотоксины и другие вещества (3, 4). Наиболее опасны микотоксины — вторичные метаболиты плесневых грибов *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. (афлатоксины, охратоксины, зеараленон, фумонизины, дезоксиниваленол). К потенциальным угрозам для сельскохозяйственной птицы, исходящим от микотоксинов, относятся высокая вероятность контаминации зерновых микотоксинами, отсутствие нормативов по ПДК (МДУ) для большинства из них, синергизм действия (5). Для профилактики микотоксикозов у птицы применяются специализированные кормовые добавки: сорбенты микотоксинов, пробиотики, иммуномодуляторы, ферменты и др. (6).

В настоящее время для снижения концентрации микотоксинов в кормах животных и птицы используется метод энтеросорбции. Однако применяемые сорбенты (активированный уголь, гидратированные натриево-кальциевые алюмосиликаты) имеют существенные недостатки. Ведется поиск новых сорбентов, обладающих высокой и необратимой сорбционной емкостью, у которых отсутствует связывающая способность по отношению к незаменимым микро- и макроэлементам, витаминам и другим питательным веществам. Модифицирование носителей сорбентов биологически активными веществами применяется для коррекции иммунной реактивности животных, а также привнесения пробиотических свойств (7, 8).

Установлено, что естественная сопротивляемость организма птицы к действию микотоксинов всегда зависит от состояния микробиоты желудочно-кишечного тракта. При ее максимальной стабилизации и высокой резистентности патологическое действие токсинов грибной микрофлоры можно существенно снизить и практически свести к нулю. При этом конкурирующая нормальная микрофлора выделяет не один, а целую группу собственных ферментов, действующих при рН, характерных для организма хозяина. Эти ферменты подвергают биотрансформации молекулы микотоксинов в пределах целых групп и продуцентов, их синтезирующих (9).

В связи с запретом в большинстве стран Европы на включение в комбикорма антибиотиков изучаются кормовые добавки, которые могли бы их заменить (10). Доказано, что достойной альтернативой антибиотикам могут стать эфирные масла и пробиотические штаммы бактерий (11, 12). Эфирные масла представляют собой разнообразные биологически активные вещества: терпены и терпеноиды, ароматические соединения, предельные и непредельные углеводороды, альдегиды, органические кислоты

и спирты, их сложные эфиры, а также гетероциклические соединения, амины, кетоны, флавоны, фенолы, хиноны, органические сульфиды, оксиды (13-15). Потенциальная возможность терапевтического использования эфирных масел в птицеводстве обусловлена их иммуномодулирующими свойствами, антимикробной активностью в отношении патогенов, способностями усиливать выработку пищеварительного секрета, стимулировать кровообращение, оказывать антиоксидантное действие, повышать усвоение питательных веществ корма (16-18). В этом случае микрофлора пищеварительного тракта выступает в качестве высокочувствительной индикаторной системы, которая реагирует на происходящие изменения (19). С помощью молекулярно-генетических методов в микробиоме кишечника птиц обнаруживают до 140 родов бактерий, из которых только 10 % идентифицированы по гену 16S рРНК, а остальные принадлежат к новым видам и даже родам (20-22).

Благодаря успехам генетической селекции, скорость метаболических процессов у современных мясных кроссов становится выше, и лимитирующим фактором развития птицеводства оказывается способность пищеварительной системы птиц обеспечивать физиологическую эффективность метаболизма питательных веществ рационов. За последние 50 лет в мире достигнут значительный прогресс по скорости роста бройлеров и эффективности использования ими кормов (23). Причем генетический прогресс привел к изменениям в физиологии питания современной мясной птицы и составе микрофлоры ее желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (24). Для реализации генетического потенциала продуктивности птицы требуется адекватная функциональная поддержка пищеварительного тракта, в частности, регуляция состава микрофлоры.

Роль микроорганизмов желудочно-кишечного тракта в пищеварении и обмене веществ вызывает повышенный интерес в контексте обоснования более рационального и полноценного кормления, повышения продуктивности и улучшения состояния здоровья птицы в целом (25-28). Микробиом кишечника птицы представляет собой один из первых барьеров для патогенов, поступающих с кормом (29), и играет огромную роль в функционировании макроорганизма.

Значительная часть исследований микрофлоры кишечника птиц была проведена с помощью высева культивируемых штаммов на искусственные питательные среды, что позволяло изучить менее 20 % от реального количества микроорганизмов. С 1990-х годов существенно расширилось понимание состава рубцовой микробиоты, развивались молекулярно-биологические методы изучения микроорганизмов, опирающиеся на информацию об их геноме (30-32).

В представленной работе впервые приведены данные по сравнению продуктивности молодняка кур исходных линий Б9, Б5 нового отечественного мясного кросса, а также эффективности использования ими питательных веществ корма в связи с составом микробиоты кишечника при использовании кормового антибиотика и комплексного препарата Заслон 2+, состоящего из сорбента, смеси эфирных масел и пробиотических бактерий.

Нашей целью была оценка влияния комплексного препарата энтеросорбента, содержащего биоактивные вещества и пробиотические бактерии, на живую массу, развитие репродуктивных органов, переваримость и использование питательных веществ корма, а также состав микробиома в кишечнике мясных кур.

Методика. Исследования проводили на двух исходных линиях

мясных кур (*Gallus gallus* L.) (получены в Селекционно-генетическом центре «Смена», Московская обл.) (33): Б5 — отцовская линия отцовской родительской породы формы корниш, быстрорастущая (основные селекционируемые признаки — конверсия корма, скорость роста, мясные качества); Б9 — материнская линия материнской родительской породы формы плимутрок (ведется отбор по яйценоскости, выводимости, скорости роста, конверсии корма, жизнеспособности).

В период зоотехнических и физиологических опытов (Селекционно-генетический центр «Загорское ЭПХ», г. Сергиев Посад, Московская обл., 2017 год) птицу с 1-суточного до 21-недельного возраста содержали в специальных клетках по 50 гол. в группе. Световой, температурный и влажностный режимы, фронт кормления и поения соответствовали рекомендациям ВНИТИП (34).

До 1-недельного возраста птица всех групп потребляла комбикорма из растительных компонентов вволю, со 2-й нед выращивания ежедневное количество корма ограничивали. Контрольная группа получала комбикорма растительного типа, сбалансированные по всем питательным веществам в соответствии с возрастными периодами, с добавкой кормового антибиотика Бацитрацин-30 (активность 42 ед/мг) в количестве 100 г/т на протяжении всего срока выращивания. Птица опытной группы вместо кормового антибиотика получала комплексный энтеросорбент Заслон 2+ (ТУ 9291-028-50932298-2016 от 18.11.2016, ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург) в количестве 1000 г/т корма.

Птицу исходных линий кормили рассыпными комбикормами следующей питательности: 1-21-е сут выращивания — обменная энергия 280 ккал/100 г, сырой протеин — 20 %, кальций — 1,0 %, фосфор — 0,7 %, лизин общий — 1,15 %, доступный — 0,95 %, метионин общий — 0,45 %, доступный — 0,39 %; 22-35-е сут — соответственно 275 ккал/100 г, 18; 1,0; 0,7; 0,9; 0,76; 0,38; 0,32 %; 36-105-е сут — соответственно 265 ккал/100 г, 14; 1,0; 0,65; 0,65; 0,58; 0,30; 0,26 %; 106-147-е сут — 270 ккал/100 г; 15%; 1,5; 0,7; 0,64; 0,57; 0,30; 0,26 %.

Птицу всех групп взвешивали еженедельно. В 4- и 7-недельном возрасте проводили балансовые опыты, для чего из каждой группы отбирали по 3 гол. со средней живой массой. Птицу помещали в специальные балансовые клетки. Предварительный период опыта длился 5 сут, учетный — 3 сут. Регистрировали потребление корма, в учетный период — также количество выделенного помета. Следили за живой массой птицы в начале и конце опыта. Аммиак в средней пробе помета фиксировали 0,1 н. раствором щавелевой кислоты (4 мл/100 г помета). По окончании балансового опыта образцы высушивали при температуре 60-70 °С и хранили в емкости с притертой крышкой в холодильнике. По данным ежесуточного учета массы корма и помета, а также их состава рассчитывали количество выделенных и усвоенных веществ.

После убоя птицы в 21-недельном возрасте взвешивали семенники у петушков, яичники и яйцеводы у самок (из каждой группы по $n = 3$). У этих же особей в кишечнике изучали состав микробиома.

Состав микрофлоры слепых отростков кишечника исследовали методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва), следуя рекомендациям производителя. ПЦР проводили с эубактериальными праймерами 63F 5'-CAGGCCTAACAC-ATGCAAGTC-3' с меткой на 5'-конце (флуорофор D4 WellRED, «Sigma-Aldrich, Inc.», США) и 1492R 5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3'

(ДНК-амплификатор Verity, «Life Technologies, Inc.», США). Эти праймеры позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК с позициями от 63-й до 1492-й (нумерация указана для гена 16S рРНК *Esherichia coli*) в режиме: 3 мин при 95 °С (1 цикл); 30 с при 95 °С, 40 с при 55 °С, 60 с при 72 °С (35 циклов); 5 мин при 72 °С. Флуоресцентно меченные ампликоны очищали по стандартной методике (35). Концентрацию очищенных фрагментов гена 16S рРНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 («Invitrogen», Германия). Ампликоны (30–50 нг) подвергали воздействию эндонуклеаз рестрикции *NaеIII*, *NhaI* и *MspI* («Fermentas», Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью секвенатора СЕQ 8000 («Beckman Coulter», США). Принадлежность бактерий к филогенетическим группам определяли с использованием программы Fragment Sorter и базы данных (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Microsoft Excel. Определяли средние значения (*M*) и стандартные ошибки средних (\pm SEM). Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. При оценке таксономического разнообразия рассчитывали индексы Шеннона, Симпсона, Маргалёфа и Бергера-Паркера.

Результаты. Препарат Заслон 2+ обладает полифункциональными свойствами, которые обусловлены адсорбционными характеристиками диатомита и биологически активными свойствами эфирных масел тимьяна, лимона, чеснока, шалфея. Кроме того, в его составе присутствует модификатор — штамм бактерии *Bacillus* sp. в количестве 10^5 КОЕ/г.

1. Живая масса (г) курочек и петушков двух линий, а также потребление корма (г · гол.⁻¹ · сут.⁻¹) при включении в рацион кормового антибиотика или комплексного энтеросорбента в зависимости от возраста ($M \pm$ SEM; СГЦ «Загорское ЭПХ», г. Сергиев Посад, Московская обл., 2017 год)

Возраст, нед	Линия									
	Б5				ПК	Б9				ПК
	♂ К	♀ О	♂ К	♀ О		♂ К	♀ О	♂ К	♀ О	
1	230±4,8	234±5,3	225±5,0	231±4,2	272	214±2,6	220±2,8	210±4,2	207±3,8	251
2	337±5,6	342±6,2	328±5,5	337±4,7	294	290±4,4	280±5,2	277±6,0	280±4,9	280
3	621±7,5	630±8,6	600±7,0	610±7,5	350	522±6,2	501±5,8	490±7,2	494±6,8	336
4	784±9,6	777±10,3	710±11,3	687±10,8	434	677±10,3	650±9,5	599±8,8	600±9,0	420
5	941±15,3	939±14,6	801±17,9	815±16,5	469	835±14,6	840±13,3	715±12,4	720±11,6	455
6	1107±18,6	1118±20,0	975±17,6	990±16,9	476	990±17,3	989±15,9	845±14,6	849±14,0	462
7	1255±21,3	1269±20,5	1015±18,3	1009±19,2	504	1225±20,4	1218±18,6	1042±17,1	1034±16,8	490
8	1447±24,8	1427±22,6	1165±20,0	1148±18,4	511	1384±22,6	1370±20,4	1130±18,6	1125±16,2	497
9	1599±22,4	1560±20,1	1233±20,2	1240±21,3	518	1445±24,5	1482±22,7	1162±20,8	1217±20,0	504
10	1784±26,6	1782±25,4	1435±23,3	1437±22,7	525	1581±25,0	1590±26,2	1290±24,1	1280±23,6	511
11	1893±28,0	1919±27,2	1544±26,6	1566±25,1	546	1610±25,3	1609±24,4	1381±25,5	1374±22,4	532
12	2011±30,4	2010±28,2	1710±25,4	1710±27,0	553	1803±28,1	1810±26,6	1464±26,8	1459±25,5	539
13	2107±32,2	2118±30,8	1735±28,7	1736±29,0	560	1881±30,4	1884±28,5	1527±28,1	1510±26,8	546
14	2270±34,3	2269±33,7	1864±32,4	1868±31,6	574	1935±32,6	1937±33,3	1590±30,4	1613±28,3	560
15	2490±36,6	2490±36,0	1907±34,5	1910±33,3	602	1981±34,8	1980±35,5	1680±33,6	1671±33,2	588
16	2525±34,2	2537±32,6	1936±28,6	1949±28,0	623	2133±35,3	2141±34,9	1708±30,7	1715±32,2	609
17	2647±36,4	2650±35,8	2001±34,3	2014±35,2	630	2270±36,8	2271±35,6	1761±32,2	1772±31,8	616
18	2688±35,0	2778±34,3	2187±36,8	2190±34,6	658	2361±37,7	2361±37,1	1802±34,6	1804±35,5	644
19	2933±34,3	2945±35,7	2209±38,4	2217±35,8	714	2484±38,5	2482±38,8	1840±35,2	1850±34,8	672
20	3066±36,5	3082±37,8	2230±36,5	2234±36,8	728	2510±40,2	2509±40,0	1890±37,6	1887±38,2	682
21	3171±38,8	3168±40,1	2307±40,6	2317±38,4	770	2574±44,6	2592±42,8	1924±38,6	1930±39,8	730

Примечание. К и О — соответственно контроль и опыт, ПК — потребление корма за 1 нед. Описание групп см. в разделе «Методика».

Поведенные опыты показали, что по живой массе петушки и курочки линий Б5 и Б9 из контрольной и опытной групп практически не различались (табл. 1). В 21-недельном возрасте петушки и курочки линии Б5 опытной группы имели живую массу 3172 и 2318 г, контрольной груп-

пы — 3169 и 2316 г, для линии Б9 эти показатели составляли соответственно 2590 и 1917 г (опыт), 2589 и 1920 г (контроль). Сохранность птицы по всем группам была высокой и составила 100 %. За весь период выращивания расход корма на 1 гол. для линии Б5 составил 11,311 кг, для линии Б9 — 10,924 кг. Конверсия корма в опытных группах при использовании препарата Заслон 2+ достоверно не отличалась от контроля.

Результаты физиологического (балансового) опыта, проведенного в 4- и 7-недельном возрасте птицы, согласуются с данными по живой массе молодняка. Существенных различий по переваримости сухого вещества корма, жира и использованию азота корма между птицей контрольных и опытных групп установлено не было. Однако петушки и курочки линии Б5 на 4,14 % лучше переваривали сухое вещество корма при большем (на 3,04 %) использовании азота. При этом переваримость жира была также выше (на 3,12 %).

Масса семенников у петушков в 21-недельном возрасте в контрольной и опытной группе не имела достоверных различий и находилась в пределах 8,3-9,4 г (линия Б5) и 7,5-8,8 г (линия Б9) в контрольной группе, 8,1-9,3 г (линия Б5) и 7,6-9,4 г (линия Б9) — в опытной группе. По массе яичников и яичников с яйцеводом существенных различий также не установлено. Масса яичников в контрольной группе составляла 1,82-1,89 г (линия Б5) и 1,71-1,88 г (линия Б9), в опытной — 1,82-1,99 г (линия Б5) и 1,788-1,97 г (линия Б9); масса яичников с яйцеводом в контрольной группе — 5,44-5,72 г (линия Б5) и 5,68-5,67 г (линия Б9), в опытной — 5,67-5,80 г (линия Б5) и 5,63-5,77 г (линия Б9).

2. Состав микробного сообщества в содержимом 12-перстной кишки у мясных кур двух линий при включении в рацион кормового антибиотика или комплексного энтеросорбента ($M \pm SEM$; СГЦ «Загорское ЭПХ», г. Сергиев Посад, Московская обл., 2017 год)

Микроорганизм, индекс доминирования	Линия Б5		Линия Б9	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Число филотипов	110,0±5,4	49,0±2,5*	57,0±2,5	18,0±0,8*
Индекс Симпсона	0,91±0,36	0,87±0,03	0,82±0,03	0,72±0,03
Индекс Шеннона	3,39±0,23	2,62±0,12***	2,53±0,13	1,70±0,07***
Индекс Маргалефа	22,55±1,10	9,76±0,47*	11,19±0,51	3,33±0,15*
Индекс Бергера-Паркера	0,21±0,01	0,27±0,01	0,34±0,02	0,39±0,01
	Ф и л у м <i>Firmicutes</i>			
Сем. <i>Lactobacillaceae</i> , %	89,05±5,30	39,19±2,30*	74,26±3,60	64,53±3,36**
Сем. <i>Veillonellaceae</i> , %	Н.п.д.о.	3,82±0,23*	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.
Сем. <i>Bacillaceae</i> , %	Н.п.д.о.	12,50±0,58*	3,59±0,15	4,32±0,23***
<i>Staphylococcus</i> sp., %	Н.п.д.о.	0,83±0,03	0	Н.п.д.о.
Сем. <i>Clostridiaceae</i> , %	0,31±0,02	0,38±0,02	Н.п.д.о.	0,97±0,04
<i>Clostridium novyi</i> и/или <i>Cl. perfringens</i> , %	0,48±0,04	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.
	Ф и л у м <i>Bacteroidetes</i>			
Пор. <i>Bacteroidales</i> , %	Н.п.д.о.	4,02±0,25	0,48±0,03	1,43±0,07**
	Ф и л у м <i>Actinobacteria</i>			
Пор. <i>Actinomycetales</i> , %	Н.п.д.о.	0,82±0,03	0,69±0,02	Н.п.д.о.
<i>Bifidobacterium</i> sp., %	Н.п.д.о.	0,56±0,03*	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.
	Ф и л у м <i>Proteobacteria</i>			
<i>Campylobacter</i> sp., %	1,04±0,06	0,26±0,01*	0,51±0,01	Н.п.д.о.
Сем. <i>Pseudomonadaceae</i> , %	Н.п.д.о.	1,66±0,07	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.
	Ф и л у м <i>Fusobacteria</i>			
<i>Fusobacterium</i> sp., %	0,40±0,02	1,01±0,04*	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.
	Ф и л у м <i>Tenericutes</i>			
<i>Mycoplasma</i> sp., %	Н.п.д.о.	Н.п.д.о.	0,53±0,01	Н.п.д.о.
	Некультивируемые бактерии			
	3,98±0,28	27,94±1,50*	4,06±0,26	9,22±0,36**

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

*, ** и *** Соответственно $p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем, Н.п.д.о. — ниже предела достоверного определения методом T-RFLP.

С помощью метода T-RFLP в составе микрофлоры содержимого 12-перстной кишки кур линий Б5 и Б9 выявили от 18,0±0,8 до 110,0±5,4

филотипов бактерий в зависимости от варианта опыта (табл. 2). Расчет индексов Шеннона, Симпсона и Маргалефа показал более выраженное таксономическое разнообразие и сложность структуры микробных сообществ 12-перстной кишки в контрольных вариантах обеих линий. Это указывает на неопределенность и неоднородность составов микробиоценоза, накопление энтропии и определенной дезорганизации по сравнению с опытными группами.

Значительную долю микроорганизмов, выявленных в слепых отрезках кишечника кур во всех исследованных группах, не удалось отнести ни к одному существующему таксону. У кур обеих линий количество неидентифицированных бактерий в опытных группах было достоверно выше ($p \leq 0,01$), чем в контроле.

Состав атрибутируемых микроорганизмов кишечника мясных кур у обеих линий был сходен. В большинстве исследованных образцов бактерии в структуре кишечной микробиоты были отнесены к 5 филумам: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*. В контрольном варианте у кур линии Б9 были обнаружены представители филума *Tenericutes* (род *Mycoplasma*). Доминирующими во всех исследованных вариантах оказались бактерии, принадлежащие к филуму *Firmicutes*. Эти результаты частично согласуются с данными, полученными ранее другими авторами (30, 31, 36). Так, было продемонстрировано, что из 13 бактериальных филумов, выявленных в кишечнике цыплят и индеек, доминирующими были *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, на долю которых приходилось более 90 % всех проанализированных последовательностей (37).

Несмотря на общее сходство в составах микробиоценозов кишечника мясных кур двух линий, в структуре микрофлоры наблюдались некоторые различия. Например, в кишечнике у кур контрольной группы линии Б5 присутствовали бактерии сем. *Clostridiaceae*, родов *Fusobacterium*, *Clostridium novyi*/*Cl. perfringens*, тогда как у птицы линии Б9 эти микроорганизмы мы не выявили. Известно, что представители семейства *Clostridiaceae* могут играть положительную роль в пищеварении птиц, поскольку способны образовывать ряд пищеварительных ферментов, в том числе целлюлаз, что позволяет макроорганизму эффективно использовать энергию кормов, богатых клетчаткой. Виды *Clostridium novyi* и *Clostridium perfringens*, напротив, нередко ассоциируются с гастроэнтеритами и хромотой у кур (38, 39), среди бактерий рода *Fusobacterium* также встречаются патогенные формы.

Введение комплексного энтеросорбента с фитобиотическими свойствами в рацион птицы обеих линий способствовало изменению качественного состава микробиома 12-перстной кишки. В результате применения препарата Заслон 2+ в 12-перстной кишке у особи линии Б5 происходило увеличение численности бактерий рода *Bifidobacterium* и порядка *Bacteroidales* и снижение содержания бактерий рода *Campylobacter*. Это свидетельствует о нормализации баланса микрофлоры в ЖКТ, поскольку бактерии рода *Bifidobacterium*, обитая в просвете кишечника, обладают антимикробной и иммуномодулирующей активностью, синтезируют витамины и некоторые незаменимые аминокислоты, а микроорганизмы порядка *Bacteroidales* способны к синтезу ферментов, расщепляющих сложные полисахариды и крахмал кормов. Среди представителей рода *Campylobacter* нередко встречаются патогенные формы, такие как *Campylobacter jejuni* (40). Вероятно, позитивные изменения в составе микрофлоры под влиянием Заслона 2+ были связаны с антимикробной активностью эфирных ма-

сел и пробиотического штамма бактерии в составе препарата. С одной стороны, механизм действия пробиотических штаммов бактерий заключался в синтезе биологически активных веществ, обладающих антимикробной активностью, с другой — штаммы бактерий могли колонизировать ЖКТ посредством адгезии, образуя защитный слой, покрывающий поверхность слизистого эпителия, который одновременно механически и функционально блокировал колонизацию кишечника патогенными микроорганизмами (41). Данные наших исследований согласуются с результатами, полученными ранее. Так, Y. Wang с соавт. (42) показали, что в микробиоме слепых отростков кишечника кур, в рацион которых вводили пробиотические штаммы бактерий, доминировали бактерии рода *Bacteroides*, относящиеся к порядку *Bacteroidales*. Несмотря на положительные сдвиги в составе микрофлоры под влиянием препарата в опытной группе нашем исследовании, в 12-перстной кишке у птиц линии Б5, в рацион которых входил Заслон 2+, снижалась численность бактерий семейства *Lactobacillaceae*. Молочнокислые бактерии семейства *Lactobacillaceae* играют важную роль в кишечнике птиц, поскольку синтезируют в качестве основного продукта метаболизма лактат, снижающий рН химуса, что приводит к подавлению патогенных форм.

При введении в рацион птиц линии Б9 препарата Заслон 2+ в 12-перстной кишке увеличивалась численности бактерий семейства *Bacillaceae* и целлюлозолитических бактерий семейства *Clostridiaceae*. Представители семейства *Bacillaceae* обладают способностью к синтезу широкого набора бактериоцинов (43), эффективно угнетающих развитие патогенных бактерий (44). Поэтому возрастание численности бактерий этих групп может указывать на коррекцию дисбиотических нарушений в кишечнике.

Таким образом, использование кормовой добавки Заслон 2+ в комбикормах для молодняка кур отечественных исходных линий Б5 (порода корниш) и Б9 (порода плимутрок) вместо кормового антибиотика не приводило к достоверным изменениям в живой массе птицы. Развитие репродуктивных органов самцов (семенников) и самок (яичников и яйцеводов) в обеих группах оставалось в пределах нормы без статистически значимых различий. Переваримость и использование питательных веществ корма между группами молодняка существенно не различались. Методом T-RFLP выявлены некоторые различия в составе микробиоценозов 12-перстной кишки у изученных групп. Количество неидентифицированных бактерий в опытных группах превышало таковое в контроле. У линии Б9 в результате введения в рацион птицы препарата Заслон 2+ в 12-перстной кишке происходило увеличение численности бактерий семейства *Bacillaceae* и целлюлозолитических бактерий семейства *Clostridiaceae*, а у птицы линии Б5 — численности бактерий рода *Bifidobacterium* и порядка *Bacteroidales*, а также снижение содержания бактерий рода *Campylobacter*. Возрастание численности бактерий указанных групп и снижение доли патогенных микроорганизмов может указывать на коррекцию дисбиотических нарушений в кишечнике птицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фисинин В. Рынок продукции птицеводства стабилен. *Животноводство России*, 2019, 3: 8-11.
2. Егорова А.В. Мясные куры родительского стада: оценка, отбор и подбор птицы. *Птицеводство*, 2012, 12: 8-10.

3. Biggs P., Parsons C.M., Fahey G.C. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poultry Science*, 2007, 86(11): 2327-2336 (doi: 10.3382/ps.2007-00427).
4. Chichlowski M., Croom J., McBride B.W., Daniel L., Davis G., Kaci M.D. Direct-fed microbial PrimaLac and Salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in the broiler chick. *Poultry Science*, 2007, 86(6): 1100-1106 (doi: 10.1093/ps/86.6.1100).
5. Murugesan G.R., Ledoux D.R., Naehrer K., Berthiller F., Applegate T.J., Grenier B., Phillips T.D., Schatzmayr G. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry Science*, 2015, 94(6): 1298-1315 (doi: 10.3382/ps/pev075).
6. Peng W.-X., Marchal J.L.M., van der Poel A.F.B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 237: 129-153 (doi: 10.1016/j.anifeeds.2018.01.017).
7. Stanley D., Hughes R.G., Moore R. Microbiota of chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(10): 4301-4310 (doi: 10.1007/s00253-014-5646-2).
8. Surai P.F. Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2014, 98(1): 19-31 (doi: 10.1111/jpn.12070).
9. Loi M., Fanelli F., Liucci V.C., Logrieco A.F., Muli G. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. *Toxins*, 2017, 9(4): 111 (doi: 10.3390/toxins9040111).
10. Smith J.A. The future of poultry production in the USA without antibiotics. *Poultry International*, 2002, 9: 68-69.
11. Крюков В.С., Глебова И.В. Антибактериальное действие эфирных масел лекарственных растений (обзор). *Проблемы биологии продуктивных животных*, 2017, 3: 5-25.
12. Yang Ch., Chowdhury M.A.K., Hou Y., Gong J. Phytochemicals as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. *Pathogens*, 2015, 4(1): 137-156 (doi: 10.3390/pathogens4010137).
13. Jamroz D., Wiliczekiewicz A., Wertelecki T., Orda J., Skorupińska J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *British Poultry Science*, 2005, 46(4): 485-493 (doi: 10.1080/00071660500191056).
14. Jang I.S., Ko Y.H., Kang S.Y., Lee C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 134(3-4): 304-315 (doi: 10.1016/j.anifeeds.2006.06.009).
15. Adil S., Magray S.N. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(6): 873-877 (doi: 10.3923/javaa.2012.873.877).
16. Windisch W., Schedle K., Piltzner C., Kroismayr A. Use of phytochemical products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 2008, 86: E140-E148 (doi: 10.2527/jas.2007-0459).
17. Brenes A., Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 2010, 158(1-2): 1-14 (doi: 10.1016/j.anifeeds.2010.03.007).
18. Zeng Z., Zhang S., Wang H., Piao X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 6(1): 7-18 (doi: 10.1186/s40104-015-0004-5).
19. Borda-Molina D., Seifert J., Camarinha-Silva A. Current perspectives of the chicken gastrointestinal tract and its microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2018, 16: 131-139 (doi: 10.1016/j.csbj.2018.03.002).
20. Amit-Romach E., Sklan D., Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*, 2004, 83(7): 1093-1098 (doi: 10.1093/ps/83.7.1093).
21. Apajalahti J., Kettunen A., Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 2004, 60(2): 223-232 (doi: 10.1079/WPS200415).
22. Фисинин В.И., Егоров И.А., Манукян В.А., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Ильина Л.А., Новикова Н.И. Метагеномные исследования микрофлоры кишечника птицы — основа выбора кормовых добавок. *Птица и птицепродукты*, 2014, 6: 37-39.
23. Havenstein G.B., Ferket P.R., Qureshi M.A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, 2003, 82(10): 1500-1508 (doi: 10.1093/ps/82.10.1500).
24. Lumpkins B.S., Batal A.B., Lee M.D. Evaluation of the bacterial community and intestinal development of different genetic lines of chickens. *Poultry Science*, 2010, 89(8): 1614-1621 (doi: 10.3382/ps.2010-00747).
25. Ленкова Т., Егорова Т., Меньшенин И. Больше полезной микрофлоры с пробиотиком.

- Комбикорма*, 2013, 10: 79-81.
26. Ленкова Т.Н., Егорова Т.А., Сысоева И.Г., Карташов М.И. Больше полезной микрофлоры — выше продуктивность. *Птицеводство*, 2015, 5: 7-10.
 27. Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Никонов И.Н., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Грозина А.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Фисинин В.И., Егоров И.А. Таксономическое разнообразие микробиома слепых отростков кишечника у цыплят-бройлеров и его изменение под влиянием комбикормов с подсолнечным шротом и сниженной обменной энергией. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50(6): 817-824 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.817rus).
 28. Фисинин В.И., Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Никонов И.Н., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Грозина А.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Егоров И.А. Бактериальное сообщество слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров на фоне питательных рационов различной структуры. *Микробиология*, 2016, 85(4): 472-480 (doi: 10.7868/S0026365616040054).
 29. Van Dijk A., Veldhuizen E.J.A., Kalkhove S.I.C., Tjeerdsmas-van Bokhoven J.L.M., Romijn R.A., Naagsman H.P. The β -defensin gallinacin-6 is expressed in the chicken digestive tract and has antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(3): 912-922 (doi: 10.1128/AAC.00568-06).
 30. Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J.J., Lee M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6816-6824 (doi: 10.1128/AEM.69.11.6816-6824.2003).
 31. Jozefiak D., Rutkowski A., Kaczmarek S., Jensen B.B., Engberg R.M., Hojberg O. Effect of beta-glucanase and xylanase supplementation of barley- and rye-based diets on caecal microbiota of broiler chickens. *British Poultry Science*, 2010, 51(4): 546-557 (doi: 10.1080/00071668.2010.507243).
 32. Li J., Hao H., Cheng G., Liu Ch., Ahmed S., Shabbir M.A.B., Hussain H.I., Dai M., Yuan Z. Microbial shifts in the intestinal microbiota of *Salmonella* infected chickens in response to enrofloxacin. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1711 (doi: 10.3389/fmicb.2017.01711).
 33. Егорова А.В., Тучемский Л.И., Емануйлова Ж.В., Ефимов Д.Н. Продуктивность родительских форм мясных кур селекции селекционного-генетического центра «Смена». *Зоотехния*, 2015, 6: 2-4.
 34. Егоров И.А., Манукян В.А., Ленкова Т.Н., Околелова Т.М., Лукашенко В.С., Шевяков А.Н., Игнатова Г.В., Егорова Т.В., Андрианова Е.Н., Розанов Б.Л., Лысенко М.А., Егорова Т.А., Грозина А.А., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Александрова И.Л., Ильина Л.А., Новикова Н.И., Фисинин В.И. *Методика проведения научных и производственных исследований по кормлению сельскохозяйственной птицы. Молекулярно-генетические методы определения микрофлоры кишечника*. Сергиев Посад, 2013.
 35. *Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии*. Пер. с англ. /Под ред. К. Уилсона, Дж. Уолкера. М., 2013.
 36. Singh K.M., Shah T., Deshpande S., Jakhesara S.J., Koringa P.G., Rank D.N., Joshi C.G. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 10595-10602 (doi: 10.1007/s11033-012-1947-7).
 37. Wei S., Morrison M., Yu Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poultry Science*, 2013, 92(3): 671-683 (doi: 10.3382/ps.2012-02822).
 38. Peterson E.H. *Clostridium novyi* isolated from chickens. *Poultry Science*, 1964, 43(4): 1062-1063 (doi: 10.3382/ps.0431062).
 39. Cooper K.K., Theoret J.R., Stewart B.A., Trinh H.T., Glock R.D., Songer J.G. Virulence for chickens of *Clostridium perfringens* isolated from poultry and other sources. *Anaerobe*, 2010, 16(3): 289-292 (doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.02.006).
 40. Pielsticker C., Glünder G., Rautenschlein S. Colonization properties of *Campylobacter jejuni* in chickens. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2012, 2(1): 61-65 (doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.9).
 41. Lan Y., Verstegen M., Tamminga S., Williams B. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, 2005, 61: 95-104 (doi: 10.1079/WPS200445).
 42. Wang Y., Sun J., Zhong H., Li N., Xu H., Zhu Q., Liu Y. Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6400 (doi: 10.1038/s41598-017-06677-z).
 43. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. *Спорообразующие аэробные бактерии, производящие биологически активные вещества*. Киев, 1982.
 44. Guo X., Li D., Lu W., Piao X., Chen X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 90(2): 139-146 (doi: 10.1007/s10482-006-9067-9).

POULTRY DIETS WITHOUT ANTOBIOTICS. I. INTESTINAL MICROBIOTA AND PERFORMANCE OF BROILER (*Gallus gallus* L.) BREEDERS FED DIETS WITH ENTEROSORBENT POSSESSING PHYTOBIOTIC AND PROBIOTIC EFFECTS

I.A. Egorov¹, T.N. Lenkova¹, V.A. Manukyan¹, T.A. Egorova¹, I.N. Nikonov¹, L.A. Ilina²,
G.Yu. Laptev²

¹Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia, e-mail olga@vnitip.ru, dissovet@vnitip.r ✉ corresponding author), manukyan@vnitip.ru, eta164@mail.ru, ilnikonov@yandex.ru;

²JSC «Biotrof+», 19 korp. 1, Zagrebsskii bulv., St. Petersburg, 192284 Russia, e-mail ilina@biotrof.ru, laptev@biotrof.ru

ORCID:

Egorov I.A. orcid.org/0000-0001-9122-9553

Lenkova T.N. orcid.org/0000-0001-8026-3983

Manukyan V.A. orcid.org/0000-0003-4564-4427

Egorova T.A. orcid.org/0000-0002-5102-2248

Nikonov I.N. orcid.org/0000-0001-9495-0178

Ilina L.A. orcid.org/0000-0003-2490-6942

Laptev G.Yu. orcid.org/0000-0002-8795-6659

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation, grant 16-16-04089 "Physiological and microbiological study of embryonic and postembryonic digestion in meat chickens to create feeding technologies for ensuring poultry genetic potential realization".

Received November 5, 2017

doi: 10.15389/agrobiologia.2019.2.280eng

Abstract

Recent trend of rejection of the in-feed antibiotics in animal and poultry production launched the search for reliable alternative growth stimulators, primarily probiotics, or phytobiotics (most commonly essential oils) rendering antimicrobial and antioxidant properties to improve the digestibility of dietary nutrients, suppress the growth of pathogens, etc. Another important problem is the contamination of feeds with mycotoxins which can negatively impact the productive performance in poultry. The growth efficiency and composition of intestinal microbiota were studied in growing broiler (*Gallus gallus* L.) breeders of preparental lines B5 and B9 (selected at the Center for Genetic Selection "Smena", Moscow Province) fed vegetable diets supplemented with complex preparation Zaslou 2+ (JSC Biotrof+, Russia), containing an intestinal adsorbent, a mixture of essential oils, and a strain of *Bacillus* sp. (10^5 CFU/g). Zootechnical and physiological experiments were carried out in 2017 (Smena Center, Zagorsk EPH, Sergiev Posad, Moscow Province). Control poultry fed the same vegetable diets with dietary antibiotics Bacitracin 30 (42 U/mg, a dosage of 100 g/t). Test and control groups contained 50 birds each. There were no significant differences between the control and experimental treatments in live bodyweight at 21 weeks of age: 3168 g in males and 2317 g in females in B5 line (vs. 3171 and 2307 g in control), 2592 and 1930 g in B9 line (vs. 2574 and 1924 g in control), in the development of the reproductive organs (testicles in males, ovary and oviduct in females), and in the digestibility of dietary nutrients. In the duodenal microbiota from 18 to 110 bacterial phylotypes, with statistically significant differences from control for several taxonomic groups ($p < 0.05$), were found using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. The calculated indices revealed taxonomic diversity and complexity of the intestinal bacterial communities in both control treatments (B5 and B9); in both experimental treatments more unidentified bacterial phylotypes were found in compare to the respective control treatments. An increase in the number of bacteria of the *Bacillaceae* and cellulolytic bacteria of the *Clostridiaceae* in the duodenum of the B9 line birds and an increase in the number of bacteria of the genus *Bifidobacterium* and the order *Bacteroidales*, along with a decrease in genus *Campylobacter* counts, in the duodenum of the B5 line birds occurred as a result of administration of the Zaslou 2+ preparation. Therefore, an increase in the number of bacteria in these groups and a decrease in the proportion of pathogenic microorganisms may indicate correction of dysbiotic disorders in the intestines of birds.

Keywords: preparental lines, broiler chicken, phytobiotics, intestinal adsorbent, live body-weight, intestinal microbiota.