



БИОТРОФ

здоровый микробиом
- основа продуктивности

РЕДАКТИРУЕМ МИКРОБИОМ



 (812) 322-85-50 / (812) 468-08-68

 www.biotrof.ru

Опыт применения биопрепарата «Инкубин» для обработки инкубационных яиц

Горфункель Е.П., контролер по качеству

Тюрина Д.Г., кандидат экономических наук, зам. директора по финансам

Ильина Л.А., кандидат биологических наук, начальник лаборатории

Дубровин А.В., биотехнолог

Тарлавин Н.В., биотехнолог

Соколова О.Н., кандидат биологических наук, начальник отдела контроля качества

ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург



Аннотация: Проведен опыт обработки инкубационных яиц кросса Росс-308 на 18 сутки инкубации биопрепаратом «Инкубин» на основе молочнокислых бактерий. Изучено влияние обработки на процент вывoda и на живую массу, неспецифическую резистентность (бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови) и микрофлору слепых отростков кишечника 7-суточных цыплят. Результаты показали, что биопрепарат «Инкубин» увеличивал живую массу цыплят в 7-суточном возрасте на 6,9% и оказывал иммуностимулирующее воздействие (БАСК и ЛАСК в опытной группе превышали показатели контрольной группы на 8,9 и 22,3%). В молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» были также получены результаты NGS-секвенирования, свидетельствующие о более эффективном становлении и развитии микробиома слепых отростков цыплят опытной группы по сравнению с контрольной.

Ключевые слова: инкубационные яйца, бактериальный биопрепарат, цыплята-бройлеры, неспецифическая резистентность, микрофлора ЖКТ.

Введение. Значимость микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) трудно переоценить. Существует множество средств и способов повлиять на микробиом кишечника, но необходимо помнить, что любое вмешательство должно быть обоснованным и своевременным.

Приобретение и формирование кишечного микробного сообщества - это ключевой момент для любого организма, так как баланс микрофлоры обеспечивает расщепление и усвоение питательных веществ, формирует барьер для проникновения возбудителей бактериальных болезней и поднимает иммунный статус [1].

Для человека и животных «знакомство» с представителями нормофлоры начинается еще внутриутробно. Исследования показали

наличие микрофлоры в меконии младенцев, появившихся на свет путем кесарева сечения, микроорганизмы также были выделены из плаценты и околоплодных вод [7,10]. Проникновение бактерий через физиологические барьеры называется бактериальной транслокацией, и на определенном уровне это явление присутствует в организме всегда [4]. Несмотря на доказанное отсутствие стерильных условий при развитии плода, массовая колонизация кишечника начинается в постнатальном периоде. Первым и самым важным источником кишечных микроорганизмов является мать, при контакте с которой новорожденный получает «набор» необходимых бактерий для развития своей микрофлоры [2]. Формирование микро-

флоры ЖКТ происходит поэтапно вследствие последовательной смены одного микробного сообщества другим под влиянием внешних и внутренних факторов - этот процесс называется аутогенная сукцессия [5,11]. После попадания бактерий в ЖКТ сукцессионные процессы у млекопитающих довольно последовательны и характеризуются первоначальным заселением кишечника факультативными анаэробами, такими как *Enterococcus spp.* и *Escherichia spp.*, с последующим размножением строго анаэробных микроорганизмов, таких как *Clostridium spp.* и других представителей филума *Firmicutes* [5].

Особенности формирования микрофлоры у птиц связаны с тем, что оплодотворение проис-



Рисунок 1. Поры скорлупы (а, б) и структура скорлупы куриного яйца (с) [8]

ходит *in vivo*, а развитие зародыша происходит экстракорпорально, без прямой связи с матерью. Обусловленная бактериальной транслокацией часть материнской микрофлоры способна попадать в яйцо в момент прохождения его по яйцеводу [7]. Результаты исследований инкубационных яиц, в том числе в лаборатории ООО «БИОТРОФ», подтверждают наличие в ЖКТ эмбрионов микроорганизмов, представляющих нормальную флору кишечника птицы [3,6]. Дальнейшим этапом передачи микробного сообщества является снесение яйца. В момент, когда яйцо попадает в дистальный отдел кишечника (клоаку), на поверхности скорлупы происходит формирование биопленки из кишечной микрофлоры [5]. Необходимо помнить, что в процессе остывания яйца и образования воздушной камеры бактерии частично могут попадать через поры скорлупы (рис. 1) в ее толщу, а также в пространство под ней. Таким образом, яичная скорлупа является потенциальным микробиологическим инокулятом для цыпленка [5], задача которого – дать физиологически правильный старт для сукцессионных процессов в кишечнике. В результате наследуемое микробное сообщество выполняет важнейшую роль основоположников здорового микробиома ЖКТ, меняя и под-

готавливая среду для последовательной смены доминирующих сообществ, а также выполняя функцию защиты от нежелательной микрофлоры.

В промышленном птицеводстве, в отличие от естественных условий, наседка не имеет возможности в полной мере предоставить цыпленку взрослый микробиом, так как инкубационные яйца проходят неоднократные дезинфекции. Сразу после вывода цыпленка оказываются в среде с неспецифической флорой, которая становится основой для массового заселения ЖКТ. В результате сукцессионные процессы происходят иначе, и, как следствие, возникают сопутствующие бактериальные осложнения, влекущие за собой экономические потери в виде недостаточного набора массы тела, высокого отхода и необходимости применения антибиотиков [9].

Уничтожение патогенной микрофлоры с поверхности яиц и раннее формирование здоровой микрофлоры ЖКТ у цыплят – это задачи, которые требуют решений в современных птицеводческих комплексах. С этой целью, на основе комплекса молочнокислых бактерий, обладающих полезными свойствами, был разработан отечественный биологический препарат «Инкубин» производства ООО «БИОТРОФ».

Цель исследования – изучить влияние обработки инкубацион-

ных яиц биопрепаратом «Инкубин» на развитие цыплят в первую неделю жизни.

Материал и методика исследований. Опыт проведен в ООО «БИОТРОФ» совместно с фермерским хозяйством Ленинградской области. Инкубационные яйца кросса Росс-308 после сбора были обработаны парами формалина. В процессе закладки в инкубаторы И-48 были сформированы 2 группы по 48 яиц (опытная и контрольная). Режим инкубации в группах соответствовал рекомендациям для кросса. На 18 сутки инкубации яйца опытной группы были обработаны биопрепаратом «Инкубин» спрей-методом в дозе 0,1 мл/яйцо; яйца контрольной группы биопрепаратом не обрабатывали.

Для оценки влияния обработки учитывали показатели инкубации: процент вывода и живую массу цыплят. С целью изучения отдаленных последствий обработки и ее влияния на формирование микрофлоры цыплят, выведенных из яиц опытной и контрольной группы (по 35 голов от каждой) после вывода поместили в брудеры и выращивали в течение недели. Условия содержания и кормления в группах были идентичными и соответствовали рекомендациям для кросса. У 7-суточных цыплят определяли живую массу и ее средне-суточный прирост, исследовали





Таблица 1. Влияние обработки инкубационных яиц средством «Инкубин» на вывод и развитие цыплят до 7 суток (n=35)

Показатель	Контроль	Опыт («Инкубин»)	Опыт/ контроль, %
Вывод цыплят, %	72,92	72,92	-
Живая масса, г: в 1 сут. в 7 сут.	43,14±6,83	44,48±3,06	+3,10
	165,89±16,07	177,40±13,93	+6,94
Среднесуточный прирост, г	17,54	18,99	+8,27
Показатели неспецифической резистентности, %:			
БАСК	47,32	51,54	+8,92
ЛАСК	9,94	12,16	+22,33
β-лизины	45,12	43,35	-3,92

микрофлору ЖКТ и определяли уровень неспецифической резистентности. Взвешивание цыплят проводили на лабораторных весах Scout Pro 220 SPS. Изучение микрофлоры проводили в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» методом NGS-секвенирования. Для проведения анализа от 3 цыплят из каждой группы отбирали содержимое слепых отростков. Изучение состояния факторов врожденного иммунитета (бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК), лизоцимная активность сыворотки крови (ЛАСК), β-лизины) у цыплят проводили в Санкт-Петербургском государственном университете ветеринарной медицины (СПбГУВМ); материалом для исследований служили объединенные пробы сыворотки крови от 3 цыплят из каждой группы. БАСК определяли по методу Мишеля Теффера в модификации О.В. Смирновой и Т.А.

Кузьминой; ЛАСК определялась фотоэлектроколометрическим методом по А.Г. Дорофейчику с изменением температурного режима реакции сыворотки крови с культурой *M. lisodecticus*; уровень β-лизинов определяли фотонейлометрическим методом с применением культуры *B. subtilis*.

Результаты исследований.

Обработка инкубационных яиц препаратом «Инкубин» способствовала увеличению среднесуточного прироста живой массы в первые 7 суток жизни цыплят на 8,3%. Живая масса в 7 дней в опытной группе была на 6,9% выше, чем в контроле. БАСК и ЛАСК в опытной группе превышали показатели контрольной группы на 8,9 и 22,3% соответственно, а уровень β-лизинов был на 3,92% ниже (табл. 1).

Разница между показателями вывода суточных цыплят опытной и контрольной групп в данном опыте не отмечена.

Особую значимость и интерес представляют полученные в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» данные о влиянии обработки на последующее развитие микробиома кишечника цыплят (рис. 2-5).

Гистограмма на рис. 2 ярко иллюстрирует разницу в соотношении семейств целлюлозолитических бактерий в опытной и контрольной группах. Общая доля бактерий этой группы в контроле составляет 78,11% против 80,86% в опытной. Доминирующие положение в контрольной группе занимают семейства *Lachnospiraceae* (42,46%) и *Ruminococcaceae* (29,32%). В группе с биопрепаратом «Инкубин» выявлено более разнообразное целлюлозолитическое сообщество, где помимо семейств *Lachnospiraceae* (22,50%) и *Ruminococcaceae* (32,59%) в значительных долях представлены семейство *Clostridiaceae* (9,6%) и филум *Bacteroidetes* (11,8%).

В контрольной группе доля лактобактерий (3,6%) и бифидобактерий (0,020%) в содержимом слепых отростков была выше по сравнению с опытной (1,6% и 0,016% соответственно).

Доля бактерий семейства *Veillonellaceae* (участвующих в переработке молочной кислоты в пропионовую и уксусную кислоты, углекислый газ и другие метаболиты в процессе пищеварения) в кишечнике цыплят опытной группы значительно превышала эту составляющую нормофлоры кишечника в контроле (рис. 3).

Также в содержимом слепых отростков кишечника цыплят опытной и контрольной групп были выделены такие условно-патогенные микроорганизмы, как *Mycoplasma spp.* (*M. bovis*, *M. canadense*, *M. conjunctivae*, *M. sp.*), *Staphylococcus spp.* (*St. hominis*, *St. auricularis*, *St. sp.*) и *Streptococcus spp.* (*Str. cristatus*, *Str. gordonii*, *Str. sanguinis*, *Str. sp.*). Гистограмма на рис. 4 на-

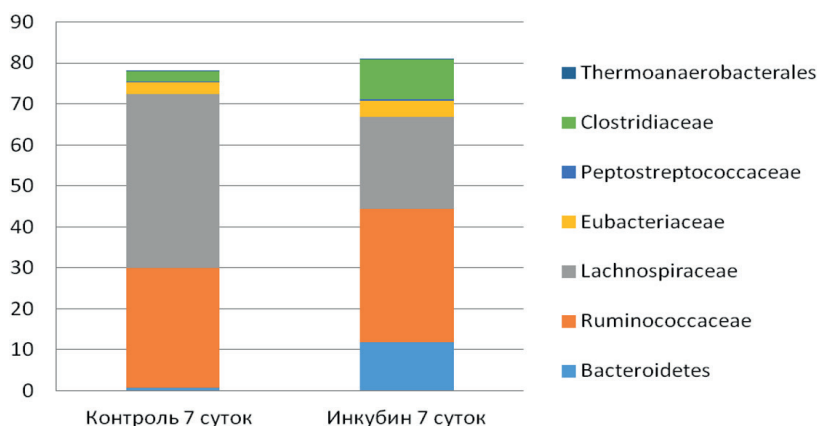


Рисунок 2. Содержание семейств целлюлозолитических бактерий в слепых отростках 7-суточных цыплят, %

глядно указывает на разницу между выявленными долями условно-патогенных микроорганизмов в контроле (0,17%) и опытной группе (0,09%).

Доля энтеробактерий в слепых отростках в опытной группе составила 1,6% против 5% в контрольной (рис. 5).

Обсуждение результатов исследований. Обработка инкубационных яиц биопрепаратом «Инкубин» на 18 суток позволила повысить среднюю живую массу цыплят в возрасте 7 суток на 11,5 г, увеличив ее среднесуточный прирост в первую неделю жизни, а также оказала иммуностимулирующий эффект, увеличив показатели факторов неспецифической резистентности (БАСК, ЛАСК). Данные NGS-секвенирования, предоставленные молекулярно-генетической лабораторией ООО «БИОТРОФ», указывают на повышение присутствия различных представителей нормофлоры ЖКТ. Микробиоценоз кишечника цыплят опытной группы отличался лучшим соотношением основных представителей микрофлоры и более выраженным биоразнообразием кишечного микробиома. В частности, за первую неделю жизни у цыплят опытной группы (в сравнении с контролем) в слепых отростках сформировалось более разнообразное микробное сообщество целлюлозолитических бактерий, представленных семействами *Ruminococcaceae* (32,59%), *Lachnospiraceae* (22,50%), *Clostridiaceae* (9,6%) и филумом *Bacteroidetes* (11,8%). Поскольку основной функцией этих микроорганизмов является расщепление растительных компонентов, раннее и гармоничное формирование микробного сообщества позволяет повысить биодоступность питательных веществ корма для развивающегося организма цыпленка.

Следует отметить разницу между группами по содержанию лакто-

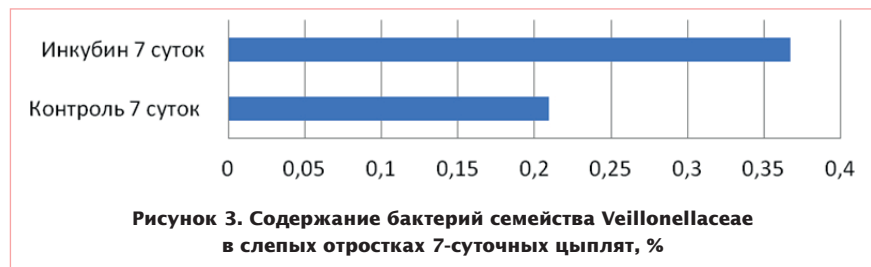


Рисунок 3. Содержание бактерий семейства Veillonellaceae в слепых отростках 7-суточных цыплят, %

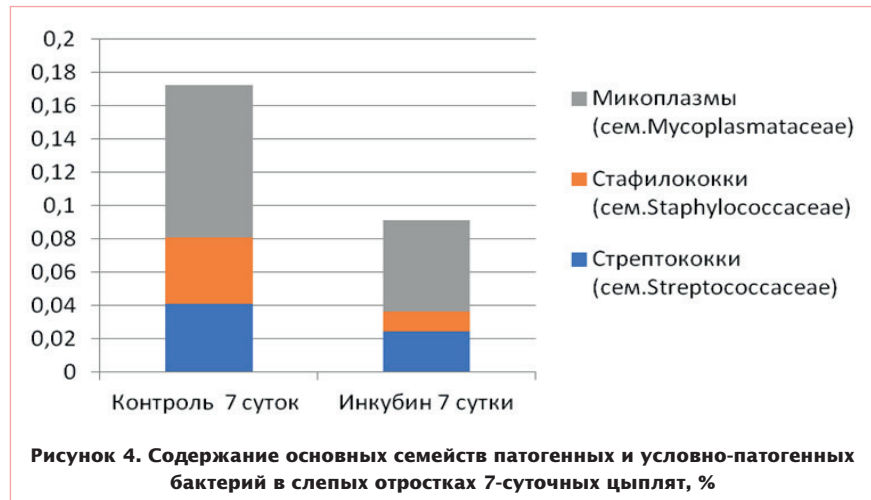


Рисунок 4. Содержание основных семейств патогенных и условно-патогенных бактерий в слепых отростках 7-суточных цыплят, %

и бифидобактерий. Несмотря на обработку яиц молочнокислыми бактериями, в кишечнике цыплят опытной группы в возрасте 7 суток их доля была меньше. Возможно, это объясняется тем, что раннее заселение кишечника молочнокислыми бактериями, вследствие обработки яиц перед началом вывода цыплят, стимулирует развитие других представителей кишечной флоры, на фоне которых доли лакто- и бифидобактерий снижаются.

Обработка яиц биопрепаратом «Инкубин» оказала влияние на соотношения патогенных и условно-патогенных бактерий в содержимом ЖКТ (рис. 4, 5). Обнаруженных *Mycoplasma spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.* в опытной группе (0,09%) было в 2 раза меньше, чем в контроле

(0,17%), а сем. *Enterobacteriaceae* (рис. 4) - в 2,9 раза меньше (1,67 против 4,96%). Энтеробактерии являются облигатными кишечными микроорганизмами, но при нарушении баланса в соотношении они, совместно со стафилококками и стрептококками, могут быть причиной бактериальных инфекций, которым особо подвержены цыплята ввиду несовершенства иммунной системы и высокого уровня вакцинальной нагрузки.

В результате обработки инкубационных яиц биопрепаратом «Инкубин» у цыплят в 7-суточном возрасте сформировалась микрофлора ЖКТ, отличающаяся более развитой долей нормофлоры и менее значимым присутствием условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

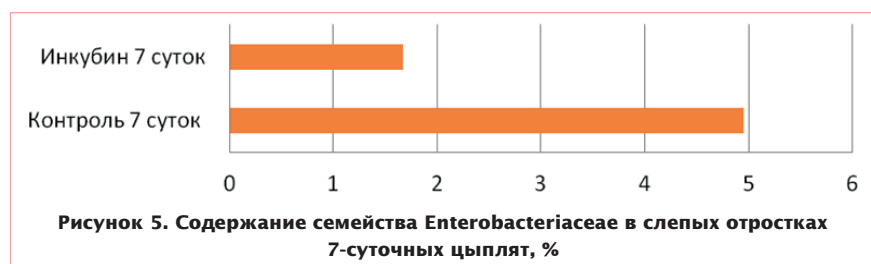


Рисунок 5. Содержание семейства Enterobacteriaceae в слепых отростках 7-суточных цыплят, %





Закключение. Выбирая средства для коррекции микрофлоры, необходимо учитывать общие биологические, микроэкологические и физиологические закономерности формирования биоценоза кишечника живого организма. Формирование микробиоценоза кишечника - это процесс, характеризующийся последовательностью сменяющихся биоценозов, в каждом периоде которого доминируют определенные представители. Нарушения в процессе становления нормофлоры ведут к снижению физиологического и иммунного статуса организма.

Молочнокислые бактерии, входящие в состав биопрепарата «Инкубин», при обработке инкубационных яиц в 18 суток, проникая через поры и микротрещины скорлупы, создают благоприятный микробный фон, стимулирующий и направляющий течение сукцессионных процессов в кишечнике, в результате которых формируется специфический микробиом, позволяющий в большей степени реализовать генетический потенциал цыплят.

Литература

1. Rubio L.A. Possibilities of early life programming in broiler chickens via in-

testinal microbiota modulation // Poult. Sci. - 2019. - V. 98, No 2. - P. 695-706.
2. Янковский Д.С., Ширококов В.П., Дымонт Г.С. Роль микробиома в формировании здоровья ребенка (обзор литературы) // Modern pediatrics. - 2019. - №5.
3. Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Горфункель Е.П., Дубровин А.В., Новикова Н.И., Тюрина Д.Г., Лаптев Г.Ю. Микробиом кур: современный взгляд // Птицеводство. - 2019. - №1. - С. 43-49
4. Подопригора Г.И., Кафарская Л.И., Байнов Н.А., Шкопоров А.Н. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты // Вестник РАМН. - 2015. - Т. 70. - №6. - С. 640-650.
5. Maki J.J., Bobeck E.A., Sylte M.J. [et al.] Eggshell and environmental bacteria contribute to the intestinal microbiota of growing chickens // J. Anim. Sci. Biotechnol. - 2020. - V. 11. - P. 60.
6. Фисинин В.И., Егоров И.А., Лаптев Г.Ю. [и др.] Выявление микроорганизмов в куриных эмбрионах методом T-RFLP // Птица и птицепродукты. - 2015. - №6.
7. Ding J., Dai R., Yang L., He Ch., Xu K. [et al.] Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens // Front. Microbiol. - 2017. - V. 8. - P. 1967.
8. Кудрявец Н.И. Косьяненко С.В. Инкубация с основами эмбриологии:

учебно-методическое пособие. - Горки: БГСХА, 2016.- 208 с.

9. Beck Ch.N., McDaniel Ch.D., Wamsley K.G.S., Kiess A.S. The potential for inoculating *Lactobacillus animalis* and *Enterococcus faecium* alone or in combination using commercial in ovo technology without negatively impacting hatch and post-hatch performance // Poult. Sci. - 2019. - V. 98, No 12. - P. 7050-7062.

10. Ardissonne A.N., de la Cruz D.M., Davis-Richardson A.G., Rechcigl K.T., Li N. [et al.] Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth // PLoS One. - 2014. - V. 9, No 3. - P. e90784.

11. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / под ред. А.Н. Суворова, Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенского. - СПб.: ИнформМед, 2013. - 270 с.

Для контакта с авторами:

Горфункель Елена Павловна

E-mail: alenkafev@mail.ru

Тюрина Дарья Георгиевна

E-mail: tiurina@biotrof.ru

Ильина Лариса Александровна

E-mail: ilina@biotrof.ru

Дубровин Андрей Валерьевич

E-mail: dubrovin@biotrof.ru

Тарлавин

Николай Владимирович

E-mail: tarlav1995@biotrof.ru

Соколова Ольга Николаевна

E-mail: sokolova@biotrof.ru

Treatment of Incubating Broiler Eggs with a Biopreparation and Its Effects on the Early Growth, Non-Specific Immunity, and Composition of Cecal Microbiota

Gorfunkel E.P., Tiurina D.G., Ilyina L.A., Dubrovin A.V., Tarlavin N.V., Sokolova O.N.

BIOTROF Co., St. Petersburg

Summary: The trial involving the treatment of broiler eggs (cross Ross-308) at day 18 of incubation with lactobacillic biopreparation Incubin (Biotrof Co., Russia) was performed; hatch and weight of day-old chicks were recorded. In hatched chicks reared to 7 days of age live bodyweight and average daily weight gain were recorded; the parameters of non-specific immunity (bactericide and lysozyme activity in blood serum) and composition of cecal microbiota (by microbiome-wide NGS technique) were determined. The preparation increased live bodyweight in 7-day chicks by 6.9% and increased bactericide and lysozyme activity in blood serum by 8.9 and 22.3%, respectively, as compared to the non-treated control. The results of the NGS also evidenced more effective formation and development of the cecal microbiota.

Keywords: incubation of eggs, lactobacillic biopreparation, broiler chicks, non-specific immunity, cecal microbiota.