

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии –
МВА имени К.И. Скрябина»

Материалы Международной научно-практической конференции

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ АНАЛИЗА
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОДУКТИВНОСТИ
И УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ
ЖИВОТНЫХ**

21–22 ноября 2019 г

**в рамках Договора № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.
о выделении гранта Правительства Российской Федерации для
государственной поддержки научных исследований**

Москва 2019 г.

УДК 636.5.082.12:57.08(06)
ББК 48.7-361.5я43

ISBN 978-5-6043642-4-6

Материалы Международной научно-практической конференции «Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных» – М.: Издательство «Сельскохозяйственные технологии», 2019. – 284 с.

Редакционная коллегия:

И.И. Кочиш, М.Н. Романов, П.Ф. Сурай, И.Н. Никонов, М.В. Селина

В сборнике представлены материалы Международной научно-практической конференции «Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных» (Москва, 21–22 ноября 2019 г.). Международная конференция организована в соответствии с Планом работ научных исследований на 2017–2019 гг. по направлению научных исследований «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве» и в рамках Договора № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г. о выделении гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований.

Международная конференция приурочена к мероприятиям, посвященным 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО МГАВМиБ –МВА имени К.И. Скрябина.

Сборник рецензирован и подготовлен к печати членами оргкомитета и под общей редакцией И.И. Кочиша, академика РАН, зав. кафедрой зоогигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина и ведущего ученого Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птиц М. Н. Романова.

Сборник материалов рекомендован для научных сотрудников, аспирантов и студентов высших учебных учреждений зооветеринарного профиля, сотрудников научно-исследовательских институтов и специалистов АПК.

ISBN 978-5-6043642-4-6

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

СОДЕРЖАНИЕ СБОРНИКА

Вступительное слово	6
Кочиш И.И. , зав. кафедрой зооигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, академик РАН, профессор, д.с.-х.н.	
Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с устойчивостью к болезням и продуктивностью у домашней птицы	11
Романов М.Н., Лаптев Г.Ю., Филиппова В.А., Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Кочиш И.И., Дубровин А.В., Новикова Н.И., Дуняшев Т.П., Новикова О.Б., Дмитриева М.Е., Смоленский В.И., Сурай П.Ф.	
Пути поддержания оптимального редокс-баланса в кишечнике птиц: проблемы и решения.....	42
Сурай П.Ф., Кочиш И.И., Фисинин В.И., Никонов И.Н., Романов М.Н.	
Полногеномное секвенирование штаммов для производства пробиотических препаратов.....	59
Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А.	
Анализ сопряженных изменений экспрессии генов и биохимических показателей крови в эксперименте на курах-несушках.....	67
Нарушин В.Г., Селина М.В., Романов М.Н.	
Исследование влияния кормовой добавки на основе эфирных масел на показатели иммунитета кур-несушек.....	83
Дубровин А.В., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Йылдырым Е.А., Новикова О.Б., Кочиш И.И.	
Влияние фитобиотика Интебио на экспрессию генов продуктивности и иммунитета у кур-несушек	93
Кочиш И.И., Мясникова О.В., Мартынов В.В.	
Особенности экспрессии генов овокаликсин-36 и овальбумин у высоко- и низкопродуктивных несушек кросса «Ломанн белый ЛСЛ»	98
Колесникова Р.Р., Мясникова О.В.	
Оценка экспрессии генов, формирующих яйценоскость у кур-несушек с различными сроками наступления половой зрелости	103
Берникова К.Е., Куванов Т.К., Мясникова О.В.	

Методы секвенирования нового поколения и агрогеномика	112
Буряков Н.П., Щукина С. А., Горст К.А.	
Генетический груз мутаций в породах крупного рогатого скота	124
Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Марзанова С.Н.	
Генетическая характеристика аллелофонда популяций крупного рогатого скота Сирии	131
Альмохаммад Альсалх Мохаммад, Бакай А.В., Лепёхина Т.В.	
Генетическая категоризация автохтонных пород овец Российской Федерации по микросателлитам	136
Марзанов Н.С., Фейзуллаев Ф.Р., Корецкая Е.А., Озеров М.Ю., Малюченко О.П.	
Молекулярно-биологические исследования при диагностике заразных болезней животных и контроле безопасности пищевых продуктов и кормов в Российской Федерации.....	148
Белоусов В.И., Варенцова А.А., Девришова З.С., Пантаз Ю.С., Немков Г.Г.	
Новый подход кормления кур (<i>Gallus gallus domesticus</i>) мясных пород без применения кормовых антибиотиков	158
Егоров И.А., Егорова Т.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Никонов И.Н., Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю.	
Оценка влияния разных кормовых добавок и препаратов на общее микробное число микрофлоры в кишечнике яичных кур	175
Мотин М.С., Мясникова О.В.	
Разработка перспективного сорбента микотоксинов для птицеводства на основе отсевов шунгитовой породы.....	182
Кочиш И.И., Егоров И.А., Никонов И.Н.	
Отбор перспективных лактобацилл, антагонистичных к <i>Campilobacter jejuni</i>	191
Макавчик С.А., Карпенко Л.Ю., Кузнецов Ю.Е., Никонов И.Н., Бахта А.А.	
Продуктивность цыплят-бройлеров при включении в выпойку фитогенной кормовой добавки в промышленных условиях.....	202
Беломожнов Т.Д., Журавлев М.С.	
Использование ферментированного подсолнечникового шрота в рационах бройлеров (на примере АО «Линдовское»)	209
Галкин А. В., Воробьева Н. В., Мясникова О. В.	

Оценка и выбор кормовых ферментов	215
Глебова И.В., Зиновьев С.В., Крюков В.С.	
Белковый концентрат в кормлении высокопродуктивных лактующих коров	225
Буряков Н.П., Бурякова М.А., Заикина А.С., Алешин Д.Е., Касаткина И.А.	
Использование пробиотического препарата в поении лактующих коров.....	236
Ковалева О.В.	
Высокоэффективные кормовые добавки для животных на основе биопленки <i>Bacillus subtilis</i> на фитоносителе	244
Ушакова Н.А., Правдин В.Г., Кравцова Л.З.	
Применение некоторых биологические активных веществ в рационах норок для повышения продуктивности	253
Балакирев Н.А., Гусельникова А.А., Любимова М.Ю.	
Биохимический маркер генетически обусловленной мясной продуктивности птиц на эмбриональной стадии	259
Титов В.Ю.	
Экологическая оценка микробиоты организма сизых голубей (<i>Columba livia</i>) в условиях радионуклидного загрязнения Брянской области	263
Кочиш И.И., Бутова И.В., Содбоев Ц.Ц., Щукин М.В., Дельцов А.А.	
Оценка цитогенетического эффекта внутреннего облучения новорожденных телят в Калужской области	269
Кочиш И. И., Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Дубасов В.В., Тележенков А.П., Кубатин И.А., Гуцин В.В., Заболотнов Г.О.	
Особенности микробиоты кишечного тракта медоносных пчел (<i>Apis mellifera</i>) в условиях Тульской области	275
Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Федоров Д.А., Булгаков А.В., Мартынова А.В.	
<i>Brassica napus</i> — кормовая культура на загрязненных радионуклидами почвах Тульской области	279
Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Дельцов А.А., Тележенков А.П., Федоров Д.А., Булгаков А.В., Мартынова А.В.	



Уважаемые коллеги!

В рамках договора № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 года о выделении грантов Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных организациях высшего образования по теме «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве» на сумму 90 млн руб. создана на кафедре зоогигиены и птицеводства им. А. К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина Международная лаборатория молекулярной генетики и геномики птицы.

Основными направлениями исследований лаборатории являются: создание современных биотехнологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью птицы к неблагоприятным факторам; разработка системы мониторинга бактерий-патогенов на различных стадиях технологического процесса выращивания и содержания кур; оценка воздействия кормовых добавок различных типов на микрофлору кишечника и продуктивность птицы яичного направления продуктивности; разработка системы профилактики бактериальных патогенов у кур-несушек на основе применения пробиотиков и фитобиотиков, заменяющих антибиотики.

17 января 2018 года состоялось официальное открытие Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы (*рис. 1*).



Рис. 1. Торжественное открытие Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы

За период выполнения проекта приобретено лабораторное оборудование для научных исследований на сумму более **20 млн руб.**

Наиболее важными и уникальными элементами оборудования лаборатории являются: высокопроизводительный секвенатор Ion Gene Studio S5 System; анализатор LightCycler 96 Instrument для ПЦП-анализа олигонуклеотидов в реальном времени; бокс для стерильных работ (модель UVT-S (-AR)) и другое оборудование (*рис. 2, 3*).

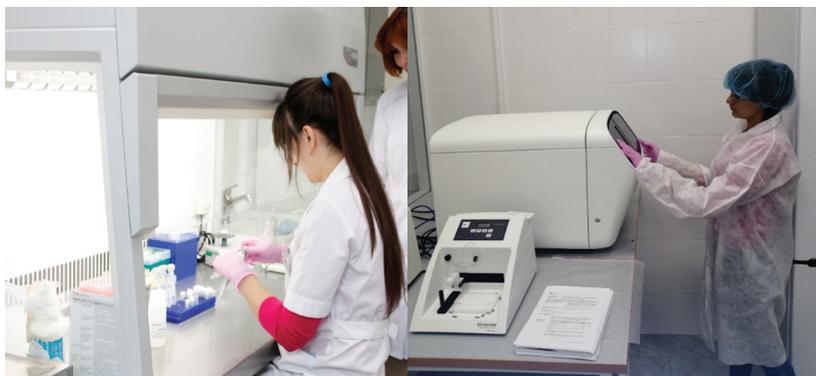


Рис. 2. Выделение totalной РНК в боксе предварительной подготовки проб, проведение эксперимента, секвенатор Ion Gene Studio S5 System



Рис. 3. Обработка результатов амплификации экспрессии генов, проведение эксперимента, аспиранты, студенты академии

Научные исследования, проводимые в Международной лаборатории, направлены на решение конкретных задач в рамках одного из главных приоритетов Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации — переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработку и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективную переработку сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания.

Уникальность лаборатории заключается в проведении исследований по анализу экспрессии генов продуктивности яичной птицы и одновременному комплексному анализу состояния микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Основные результаты деятельности лаборатории:

- Подбор 34 генов, участвующих в формировании признаков иммунитета, метаболизма и продуктивности кур, для анализа их дифференциальной экспрессии.
- Обзор методов для оценки экспрессии с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и полнотранскриптомного секвенирования

(RNASeq) генов кур, вовлеченных в проявление хозяйственно полезных признаков, в результате чего отработана и освоена комплексная технология, а также разработан информационный стенд «Нутригеномика: изучение влияния питательных веществ на экспрессию гена».

– Проведение метагеномных исследований методами T-RFLP-анализов и NGS-секвенирования микробиома в содержимом кишечника эмбрионов, цыплят и кур.

– Изучение воздействия кормовых добавок различных типов на микрофлору кишечника и продуктивность кур-несушек.

– Изучение взаимосвязи между применением кормовых добавок, микрофлорой ЖКТ, продуктивностью и уровнями экспрессии генов иммунитета и продуктивности.

– Разработка и тестирование системы мониторинга и профилактики бактерий-патогенов путем коррекции рационов питания у кур-несушек и применения антимикробных добавок (пробиотики, фитобиотики и т.д.).

– Разработка математической модели зависимости продуктивности птицы и экспрессии связанных с ней генов от состава рациона и микробиоценоза кишечника.

– Разработка и апробация основы технологии кормления яичных кур, включая протестированные композиции, обеспечивающие высокий процент реализации генетического потенциала продуктивности яичных кур.

Научные результаты опубликованы в высокорейтинговых журналах международной базы данных *Web of Science* (более 19 научных статей), в том числе первого квартиля Q1 (7 статей), и подтверждены патентами на изобретение (2 патента, 5 заявок).

Практическая значимость проводимых исследований на базе лаборатории:

– Результаты научных исследований могут быть применены в селекционно-генетических центрах и в птицеводствах (на птицефабриках) страны.

– Результаты могут применяться в разработке уникальных биопрепаратов (вакцин, пробиотиков, фитобиотиков), способствующих выработке у сельскохозяйственных животных антирезистентности к антибиотикам и приводящих к снижению доли антибиотиков в рационах питания.

– Результаты научных исследований будут способствовать повышению продуктивности птицы и улучшению конверсии корма.

– Результаты позволят создать заделы для профилактики ряда заболеваний бактериальной природы, в том числе социально-значимых (прежде всего сальмонеллёза, микоплазмоза).

Международная лаборатория стала стартовой площадкой для молодых ученых и инновационных проектов в области современных биотехнологий в сельском хозяйстве и АПК.

С уважением,

И.И. Кочиш, ключевой исполнитель проекта, заведующий кафедрой зоогигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, д-р с.-х. наук, академик РАН, профессор.

Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с устойчивостью к болезням и продуктивностью у домашней птицы

Романов М.Н.,^{1, 2} Лаптев Г.Ю.,³ Филиппова В.А.,³ Йылдырым Е.А.,³ Ильина Л.А.,³ Кочиш И.И.,¹ Дубровин А.В.,³ Новикова Н.И.,³ Дуняшев Т.П.,³ Новикова О.Б.,⁴ Дмитриева М.Е.,⁴ Смоленский В.И.,¹ Сурай П.Ф.,^{1, 5, 6, 7}

¹ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

² Университет Кента, Кентербери, Великобритания;

³ ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург, Россия;

⁴ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – Филиал ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Санкт-Петербург, Ломоносов, Россия;

⁵ Университет Святого Иштвана, Гёдёллэ, Венгрия;

⁶ Тракийский Университет, Стара Загора, Болгария;

⁷ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия.

E-mail: m.romanov@kent.ac.uk

Аннотация

Одна из наиболее распространённых инфекционных болезней в птицеводстве в Российской Федерации — это сальмонеллез, вызываемый *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). Патологический процесс, вызванный сальмонеллой, инициирует у птиц экспрессию генов, в том числе интерлейкинов (цитокинов) и β-дефензинов (галлинацинов). Еще одна группа защитных факторов макроорганизма включает симбиотические микроорганизмы кишечника. Целью данного исследования было изучение экспрессии генов иммунитета, а также бактериальных профилей слепых отростков кишечника цыплят при инфицировании штаммом бактерии SE. Исследовали также эффективность действия фитобиотика Интебио на основе эфирных масел. Эксперимент проводили на цыплятах с 1-суточного до 43-суточного возраста. Как показали результаты исследования методом количественной ПЦР, в целом заражение

сальмонеллой привело к увеличению уровня экспрессии большинства исследованных генов иммунитета в 2 и более раз. Введение в корм Интебио способствовало увеличению экспрессии генов интерлейкинов по сравнению с контролем как на фоне заражения сальмонеллой (экспрессия выросла в 4–6 раз), так и без него (экспрессия выросла в 3,5–5 раз). Через 3 недели после заражения показано снижение уровня экспрессии данных генов или тот же уровень экспрессии по сравнению с контролем. Изучение микробиологического профиля слепых отростков кишечника птиц методом T-RFLP через сутки после инфицирования выявило, что заражение птиц SE привело к значительному снижению биоразнообразия микроорганизмов в варианте без добавок. При этом содержание бактерий родов *Lactobacillus* и *Bacillus* резко падало, а микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae увеличивалось. В группе с введением фитобиотика на фоне заражения выраженного изменения состава микрофлоры не наблюдалось. Исследование микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после инфицирования выявило общую тенденцию увеличения бактериального разнообразия с возрастом вне зависимости от вариантов. Полученные данные свидетельствуют о том, что инфицирование SE приводит к активации экспрессии некоторых генов иммунитета, а также вызывает дисбиотические нарушения состава микрофлоры кишечника. На ранних стадиях заражения введение в рацион фитобиотика способствовало усилению иммунного ответа у птиц в ответ на заражение сальмонеллой. Впоследствии в вариантах с применением Интебио происходило более раннее подавление воспалительной реакции. Таким образом, опыт применения кормовой добавки Интебио в качестве иммуномодулятора и препарата с фитобиотической активностью, в том числе на фоне искусственного заражения птицы опасным патогеном, оказался весьма успешным.

Ключевые слова: экспрессия генов, RT-PCR, кишечник, микробиом, T-RFLP-анализ, сельскохозяйственная птица, цыплята

Введение

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) сельскохозяйственных животных и птиц играет важнейшую роль в поддержании иммунной защиты организма, поскольку представляет собой передовую линию столкновения защитных факторов с различными патогенами, поступающими с кормом и способными колонизировать клетки и ткани хозяина (Фисинин, Сурай, 2013).

Известно, что первая группа защитных факторов (Klasing, 2007; Фисинин, Сурай, 2013) включает физические барьеры и специальные условия

среды: наличие слизистого слоя, клетки которого обладают высокой скоростью обновления, что препятствует колонизации патогенными микроорганизмами; поддержание в железистом желудке и тонком кишечнике низких значений pH, неблагоприятных для развития патогенных микробов и др. Ко второй группе защитных факторов относят компоненты собственно иммунной системы, в частности антимикробные пептиды; лизоцим; муцин, синтез которого регулируется интерлейкинами (цитокинами), бактериальными продуктами и факторами роста; иммуноглобулины кишечника, способствующие успешной антимикробной защите; лимфоидную ткань, в которой происходит распознавание чужеродных антигенов и осуществляется ответ с участием факторов врожденного (фагоцитарные клетки, естественные киллеры, или НК-клетки, и др.) и приобретенного (В- и Т-лимфоциты и продукты их жизнедеятельности) иммунитета.

Третья группа защитных факторов — это симбиотические микроорганизмы (микробиота) кишечника и продукты их жизнедеятельности: бактериоцины, короткоцепочечные жирные кислоты и др. В настоящее время известно, что в ЖКТ птиц обитает многочисленное микробное сообщество, состоящее из бактерий, архей (Lan et al., 2005), микромицетов (Adegunloye, 2006), простейших (McDougald, 2003) и вирусов (Reynolds, 2003). Наиболее многочисленная и разнообразная микрофлора представлена в слепых отростках кишечника. Количество микроорганизмов, представленное в слепых отростках ЖКТ здоровых птиц достигает 10^{11} (Stanley, 2014; Грозина, 2016; Nikonov et al., 2017). Макроорганизм и его микрофлора, функционируя как единый орган, находятся в состоянии хрупкого равновесия. Доказано, что нормофлора стимулирует развитие некоторых тканей слепых отростков кишечника и лимфатических образований (Пейеровых бляшек) в ЖКТ млекопитающих. Было показано, что слепые отростки кишечника безмикробных животных были увеличены в размерах, стенки их утончены и лимфатические образования недоразвиты (Esmailipour et al., 2012).

У сельскохозяйственных животных и птиц слизистая оболочка кишечника формирует наибольшую поверхность контакта с внешней средой и представляет собой основные ворота для проникновения чужеродных, в том числе вредных, антигенов (патогенов): *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas saeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* и др. По данным ФГБУ «Центр ветеринарии» (Спиридонов и др., 2015), одна из наиболее распространённых инфекционных болезней в птицеводстве в Российской Федерации — это сальмонеллез, вызываемый *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). Данный патоген нередко ассоциируется с вспышками болезней пищевого происхождения у людей (Mughini-Grass

et al., 2014). Интересно, что в результате нарушения состава микрофлоры кишечника птиц вследствие антибиотикотерапии, восприимчивость макроорганизма к SE повышается в значительной степени (Barrow, 1989; Sekirov et al., 2008; Croswell et al., 2009).

Патологический процесс, вызванный сальмонеллой, инициирует у макроорганизма экспрессию генов, в том числе интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22), которые составляют основу системы врожденного иммунитета. Интерлейкины, в свою очередь, способствуют развитию воспалительной реакции.

Важную роль в контроле сальмонеллеза играют также антимикробные пептиды дефензины (Akbari et al., 2008; Wigley, 2014; Lee et al., 2017). Дефензины подразделяются на два основных класса (на основании положения дисульфидных связей): α -дефензины и β -дефензины (Menendez, Finlay, 2007; Matulova et al., 2012). α -дефензины характерны только для млекопитающих, у птиц выявлены только β -дефензины, аналогами которых являются галлинацины: Gal-1, Gal-1 α , Gal-2, Gal-4 и др. (Lynn et al., 2007). Известно, что дефензины обладают антимикробными свойствами в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов и ряда вирусов (Ganz, 2003; Barkova et al., 2017) и могут стимулировать приобретенный иммунный ответ против патогенов (Yang et al., 2002). Однако целостного представления о возникновении иммунного ответа у птицы в связи с поражением SE до сих пор не сформировалось.

К сожалению, современные интенсивные технологии выращивания сельскохозяйственной птицы в Российской Федерации для борьбы с сальмонеллезом предполагают массовое применение антибиотиков. В то же время из-за постоянного и несистемного применения антибиотиков в животноводстве и птицеводстве эффективность их воздействия на организм заметно падает, так как патогенные бактерии достаточно быстро вырабатывают антибиотикорезистентность — устойчивость к данным лекарственным веществам (Manuzon et al., 2006). Необходимость решения проблемы антибиотикорезистентности открывает большую перспективу в использовании натуральных биопрепаратов в животноводстве и птицеводстве. В последние годы научно доказано (Yang et al., 2015; Крюков, Глебова, 2017), что достойной альтернативой антибиотикам могут стать эфирные масла. 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 и другие (Jamroz et al., 2005; Jang et al.,

2007; Adil, Magray, 2012). 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 и проч. (Windisch et al., 2008; Brenes, Roura, 2010; Zeng et al., 2015).

Настоящее исследование проводилось с целью изучения экспрессии генов иммунитета, а также бактериальных профилей слепых отростков кишечника цыплят при инфицировании штаммом бактерии SE на фоне действия фитобиотика Интебио, содержащего эфирные масла.

Материалы и методы

Схема опыта

Эксперимент проводили на цыплятах с 1-суточного до 43-суточного возраста. Птицу содержали в клеточных батареях AviMax (без разделения по полу), с соблюдением всех технологических параметров, соответствующих нормам Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ ВНИТИП), а также правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях ETS No. 123 (Страсбург, 18 марта 1986 года). Кормление птицы осуществляли вручную, вволю сухими полнорационными комбикормами в соответствии с нормами для кросса, установленными ФНЦ ВНИТИП (Фисинин и др., 2011).

Цыплят в суточном возрасте разделяли на две группы-аналоги по 60 голов в группе. Цыплята группы I (контроль) получали основной рацион в виде комбикормов, сбалансированных по всем питательным веществам в соответствии с нормами ФНЦ ВНИТИП. Птицу группы II кормили аналогичными комбикормами и кормовой добавкой (фитобиотиком) Интебио (ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург). Дачу препарата начали проводить с первого дня согласно инструкции в количестве 90 г/т комбикорма. Интебио — это фитобиотик (ТУ 9362-011-50932298-2011), состоящий из носителя (пшеничных отрубей, ГОСТ 7169-66), на который нанесена смесь эфирных масел (чеснока, лимона, чабреца и эвкалипта). Вся птица в суточном возрасте была привита подкожно в верхнюю треть шеи инактивированной вакциной против болезни Гамборо.

В возрасте 19 дней половину поголовья внутримышечно инфицировали эпизоотическим штаммом SE в дозе 500 млн КОЕ и разделили на подгруппы по 30 голов в каждой: 1) контроль; 2) контроль + заражение SE; 3) Интебио; 4) Интебио + заражение SE.

Штамм SE был выделен из слепых отростков кишечника кур с использованием накопительной среды Раппапорта (производство Lab-BioMed, Германия) следующего состава (г/л): казеиновый пептон (5,0); хлористый натрий (8,0); калий фосфорнокислый двузамещенный (0,8); магний хлористый шестиводный (40,0); малахитовый зеленый (0,12). При этом 54 г сухой магниевой среды Раппапорта растворяли в 1 литре дистиллированной воды, автоклавировали 20 мин. при 115°C и получали готовую среду, имевшую рН=6,0±0,2 при 25°C.

Пробу содержимого кишечника кур растворяли в стерильном физиологическом растворе в соотношении до 1:1000, вносили 3–4 капли в пробирку со средой и инкубировали 24 ч. при 35°C. Идентификацию штамма проводили с помощью культурально-морфологических тестов согласно руководству (Черкасский и др., 1990).

Пробы тканей слепых отростков кишечника для анализа экспрессии генов и содержимого слепых отростков кишечника для анализа микрофлоры отбирали у птиц подопытных групп через сутки и три недели после инфицирования (на 20-й и 42-й день опыта) одновременно проводили учет их живой массы. Отбор образцов у подопытных птиц проводили при строгом соблюдении стерильности. Подготовку образцов осуществляли согласно официальным требованиям (Инструкция..., 1990).

Анализ экспрессии генов при помощи ПЦР в реальном времени

Анализ уровня относительной экспрессии генов иммунитета проводили при помощи ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из образцов выделяли с помощью набора Aurum™ Total RNA Mini Kit (BioRad, США) согласно инструкции производителя.

При помощи набора iScript™ Reverse Transcription Supermix (BioRad, США) осуществляли реакцию обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК (Zeka et al., 2016).

Реакцию амплификации с праймерами генов проводили при помощи набора SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, США) согласно протоколу производителя (El Houry et al., 2016).

Список праймеров представлен в табл. 1. Расчет относительной экспрессии был произведен при помощи метода 2^{-ΔΔCt} (Livak, Schmittgen, 2001). В качестве референсного гена был выбран ген белка β-актин.

T-RFLP-анализ бактериального сообщества

Состав бактериального сообщества слепых отростков кишечника птицы исследовали методом T-RFLP (Маниатис и др., 1984; Li et al. 2007; Ушакова и др., 2013; Pina et al., 2016). Тотальную ДНК из образцов

выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя.

Таблица 1. Праймеры для оценки экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе

Буквенное обозначение гена	Наименование гена/ белка	Праймеры (5'–3')
<i>AvBD9 (Gal9)</i>	β-дефензины 9, 10 и 11 (галлинацины)	F: AACACCCGTCAGGCATCTTCACA R: CGTCTTCTTGGCTGTAAGCTGGA
<i>AvBD10 (Gal10)</i>		F: GCTCTTCGCTGTCTCCTCT R: CCCAGAGATGGTGAAGGTG
<i>AvBD11 (Gal11)</i>		F: AGTCTGCAATTCGTTAGAGGCG R: GGATGTGGTTTCCAAGGGTTTA
<i>IL6</i>	Интерлейкины 6 и 8L2 (цитокины)	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R: TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT
<i>IL8L2 (IL8)</i>		F: GGAAGAGAGGTTGTGCTTGA R: TAACATGAGGCACCGATGTG
<i>CASP6</i>	Каспаза-6 (цистеиновая протеаза)	F: CAGAGGAGACAAGTGCCAGA R: CCAGGAGCCGTTACAGTTT
<i>PTGS2</i>	Простагландин-эндопероксид-синтаза-2 (циклооксигеназа 2)	F: TCGAGATCACACTTGATTGACA R: TTTGTGCCTTGTGGGTCAG
<i>IRF7</i>	Регуляторный фактор интерферона 7	F: ATCCCTTGAAGCACAAACGCC R: CTGAGGCAACCGCTAGACCTT
<i>ACTB</i>	β-актин (референсный ген домашнего хозяйства)	F: ATTGTCCACCGCAAATGCTTC R: AAATAAAGCCATGCCAATCTCGTC

ДНК-амплификацию проводили с использованием ДНК-амплификатора Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies, Inc., США) с помощью эубактериальных праймеров гена 16S рПНК: 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) — с меткой на 5'-конце (флуорофор 5' WellRED D4 Dye) и 1492R (TACGGHTACCTTGTTACGACTT), которые позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рПНК с позициями от 63 до 1492 (нумерация указана для гена 16S рПНК *E. coli*) в режиме: 95°C — 3 мин. (1 цикл); 95°C — 30 с, 55°C — 40 с, 72°C — 60 с (35 циклов), 72°C — 5 мин. (Li et al., 2007, Брюханов и др., 2012).

Флуоресцентно-меченые ампликоны гена 16S рПНК очищали с помощью 3М раствора гуанидин-изотиоционата по стандартной методике (Маниатис и др., 1984). Конечную концентрацию тотальной ДНК в растворе определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Inc., США) с использованием наборов Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Inc., США) согласно рекомендациям производителя.

Рестрикцию 30–50 нг ДНК проводили рестриктазами *Hae*III, *Hha*I и *Msp*I, следуя рекомендации изготовителя (Fermentas, Литва), в течение 2 ч. при 37°C. Продукты рестрикции осаждали этанолом, затем добавляли 0,2 мкл маркера молекулярного веса Size Standard 600 (Beckman Coulter, США) и 10 мкл формамида Sample Loading Solution (Beckman Coulter, США). Анализ проводили с помощью CEQ 8000 (Beckman Coulter, США) согласно рекомендациям производителя (Брюханов и др., 2012). Вычисление размеров пиков и их площади проводили в программе Fragment Analysis (Beckman Coulter, США), на основании чего выделяли подтипы (филотипы) с принятой в исследовании погрешностью в 1 нуклеотид и определяли их относительное содержание в микробном сообществе. Принадлежность бактерий к определенной таксономической группе определяли с использованием программы Fragment Sorter (Seviour, Nielsen, 2010; Брюханов и др., 2012).

Математическая и статистическая обработка результатов

Математическая и статистическая обработки результатов проведены стандартными методами дисперсионного анализа (Лакин, 1990) с использованием программного обеспечения Excel XP/2010. Полученные экспериментальные данные подвергались обработке с применением параметрических (критерий Стьюдента-Фишера) и непараметрических (метод Вилкоксона-Манна-Уитни) методов статистики. Оценку биологического разнообразия проводили с использованием индексов в программе Past (Hammer et al., 2001).

Результаты

Изменение уровня экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе

Как показали результаты исследования, в целом заражение сальмонеллой привело к увеличению уровня экспрессии большинства исследованных генов в 2 и более раз (рис. 1). Экспрессия генов интерлейкинов *IL6* и *IL8L2* достоверно ($p=0,05$ и $p=0,04$, соответственно) увеличилась в 4–6 раз через сутки после заражения в вариантах с применением фитобиотика по сравнению с контролем. Применение фитобиотика без заражения привело к увеличению уровня экспрессии *IL8L2* в 5 раз по сравнению с контролем ($p=0,05$). Через 3 недели после заражения показаны снижение уровня экспрессии данных генов или тот же уровень экспрессии по сравнению с контролем. Заражение сальмонеллой привело к достоверному снижению экспрессии *IL6* ($p=0,003$) без фитобиотика и с фитобиотиком ($p=0,0004$), а применение фитобиотика снизило уровень экспрессии *IL8L2* ($p=0,01$).

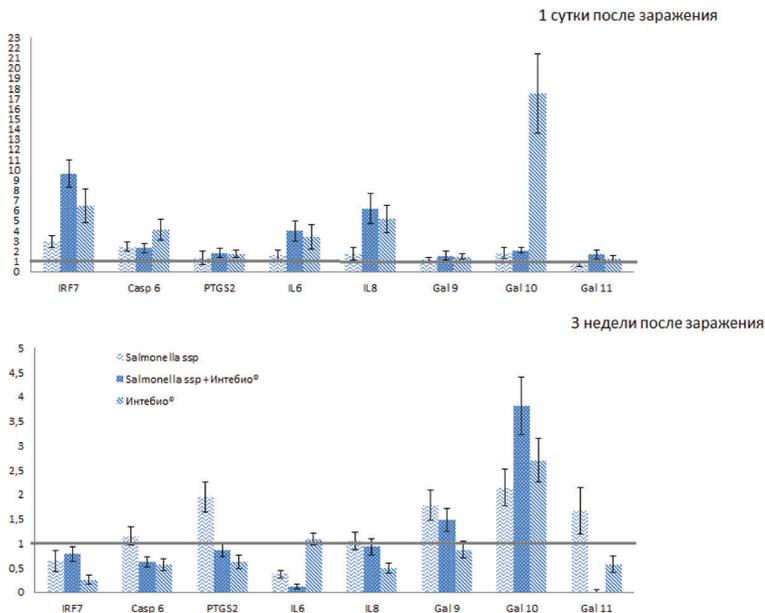


Рис. 1. Относительная экспрессия генов, участвующих в иммунном ответе, при заражении SE и применении фитобиотика

Через сутки после заражения сальмонеллой показаны незначительные изменения уровня экспрессии генов β -дефензинов *AvBD9*, *AvBD10* и *AvBD11* по сравнению с контролем. При этом экспрессия этих генов изменялась по-разному, и достоверные изменения уровня экспрессии были выявлены только для гена *AvBD10* в вариантах с применением фитобиотика. Уровень экспрессии *AvBD10* увеличился в 17 раз на фоне фитобиотика ($p=0,02$) и в 2 раза на фоне заражения и применения фитобиотика ($p=0,03$). Через 3 недели уровень экспрессии генов после заражения сальмонеллой для *AvBD9* достоверно не изменился, для *AvBD10* достоверно увеличился на фоне заражения и применения фитобиотика ($p=0,02$), а при заражении сальмонеллой на фоне применения фитобиотика через 3 недели практически не детектировался совсем.

Экспрессия гена *CASP6* — цистеиновой протеазы, играющей роль в регуляции апоптоза, увеличилась в 2,5 раза достоверно при заражении сальмонеллой как на фоне фитобиотика ($p=0,05$), так и без него ($p=0,05$) через сутки после заражения. Фитобиотик Интебио достоверно увеличил экспрессию *CASP6* в 4 раза ($p=0,05$). Через 3 недели уровень экспрессии данного гена достоверно снизился во всех вариантах с применением фитобиотика ($p=0,02$ в обоих вариантах) по сравнению с контролем без заражения.

Через сутки после заражения экспрессия гена *PTGS2* не отличалась во всех образцах, не показав достоверного различия между вариантами эксперимента. *PTGS2* (*COX-2*), или простагландин-эндопероксид-синтаза-2, — это индуцируемый фермент, экспрессируемый в ответ на различные сигналы, такие как интерлейкины и факторы роста. Через 3 недели уровень экспрессии *PTGS2* в варианте без фитобиотика при заражении сальмонеллой отличался от контроля в 2 раза в большую сторону ($p=0,05$).

Были также выявлены различия в уровнях экспрессии гена *IRF7* — регуляторного фактора интерферона 7. Через сутки после заражения сальмонеллой уровень экспрессии данного гена достоверно увеличился по сравнению с контролем в 3 раза при заражении сальмонеллой ($p=0,04$), в 9,5 раз при заражении сальмонеллой на фоне применения фитобиотика ($p=0,008$), в 6,5 раз при использовании фитобиотика без заражения ($p=0,04$). Через 3 недели уровень экспрессии *IRF7* достоверно снизился по сравнению с контролем только в варианте с применением фитобиотика ($p=0,004$).

Состав бактериального сообщества содержимого слепых отростков

Изучение микробиологического профиля слепых отростков кишечника птиц через сутки после инфицирования (*табл. 2*) выявило, что заражение птиц SE привело к значительному снижению биоразнообразия микроорганизмов в контрольном варианте без добавок. Так, среднее количество выявленных бактериальных фило типов составляло в контрольной группе с заражением $19,3 \pm 0,92$ ($p=0,003$ при сравнении с контрольным вариантом на первые сутки после заражения), тогда как в контрольном варианте без заражения количество фило типов было более чем в 2 раза выше. Полученные данные подтверждены расчетом индексов биоразнообразия (Шеннона, Симпсона, Маргалёфа, Бергера-Паркера и др.), которые имели тенденцию к резкому уменьшению в контрольном варианте с инфицированием птиц SE. Интересно, что в группе с введением фитобиотика Интебио на фоне заражения количество детектированных фило типов было достаточно высоким и составляло $75,0 \pm 3,40$ ($p=0,006$ при сравнении с контрольным вариантом на первые сутки после заражения), значения индексов биоразнообразия Шеннона, Симпсона, Маргалёфа, Бергера-Паркера и других также были высокими.

Исследование микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после инфицирования (*табл. 2*) выявило общую тенденцию увеличения бактериального разнообразия с возрастом вне зависимости от вариантов (в том числе в контрольной группе с заражением птиц SE): увеличивалось как количество бактериальных фило типов, так и значения индексов биоразнообразия (достоверность отличий см. в *табл. 2*).

Таблица 2. Количество филотипов и индексы биоразнообразия микробного сообщества слепых отростков (n=3)

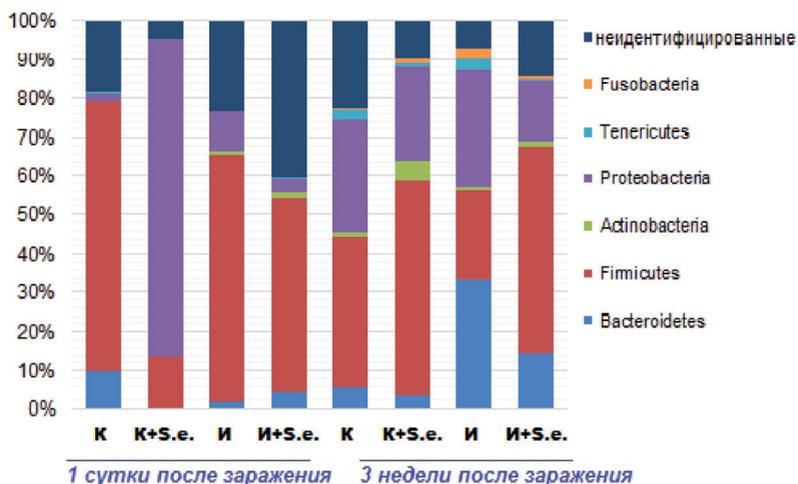
Показатели	1 сутки после заражения			3 недели после заражения				
	К*	К + S.e.*	И*	И + S.e.*	К	К + S.e.	И	И + S.e.
Кол-во филотипов	45,00±2,90	19,30±0,92***	52,00±2,10	75,00±3,40***	69,00±3,30	72,30±3,80	49,3±2,20***	73,30±3,90
Shannon	2,40±0,11	1,60±0,09**	2,60±0,17	2,50±0,13	2,90±0,17	3,10±0,14	2,10±0,13**	3,20±0,16
Simpson	0,79±0,05	0,67±0,04	0,83±0,04	0,73±0,04	0,87±0,04	0,91±0,06	0,66±0,04**	0,92±0,04
Evenness	0,25±0,02	0,27±0,02	0,28±0,02	0,17±0,01**	0,29±0,02	0,32±0,02	0,29±0,01	0,39±0,02**
Menhinick	4,50±0,21	1,90±0,05**	5,20±0,29	7,50±0,41***	6,90±0,29	7,20±0,32	4,90±0,28**	7,30±0,42
Margalef	9,60±0,51	4,00±0,21***	11,10±0,60	16,10±0,89***	14,80±0,79	15,50±0,74	10,50±0,59**	15,70±0,81
Fisher_alpha	33,20±1,65	7,50±0,41***	59,00±3,10***	266,70±15,60***	43,10±2,19	117,50±7,30***	8,30±0,49***	203,90±12,40***
Berger-Parker	0,42±0,03	0,53±0,03	0,35±0,02	0,51±0,03	0,28±0,02	0,19±0,01**	0,48±0,03**	0,17±0,01***

Примечание: * К — контроль, К + S.e. — контроль с заражением SE, И — Интебио, И + S.e. — Интебио с заражением SE; ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$ (значения p вычисляли в сравнении с контрольными вариантами отдельно в первые сутки и на третью неделю после заражения).

Как видно из рис. 2А, бактериальное сообщество слепых отростков через сутки после заражения SE практически во всех вариантах было представлено 5 атрибутируемыми филумами (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Tenericutes), а также неидентифицированными бактериями. Исключение составляют бактерии филума Tenericutes, которые отсутствовали в контрольном варианте с заражением и группе с применением Интебио без заражения.

Через сутки после инфицирования в слепых отростках кишечника птиц контрольного варианта (с заражением) происходило резкое увеличение численности бактерий филума Proteobacteria ($p=0,002$) на фоне падения содержания некультивируемых бактерий ($p=0,006$), представителей филумов Firmicutes ($p=0,001$) и Bacteroidetes ($p=0,040$) по сравнению с вариантами без заражения. В группах без заражения — с введением кормовой добавки ($p=0,007$) и без нее ($p=0,009$), а также в варианте с использованием кормовой добавки Интебио на фоне заражения ($p=0,01$) — численное преимущество имели бактерии Firmicutes по сравнению с контролем с заражением (при $p \leq 0,05$).

Изучение микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после заражения на уровне филумов выявило общую тенденцию изменения содержания представителей некоторых филумов с возрастом. Так, с возрастом происходило заселение слепых отростков кишечника представителями филума Fusobacteria.



А

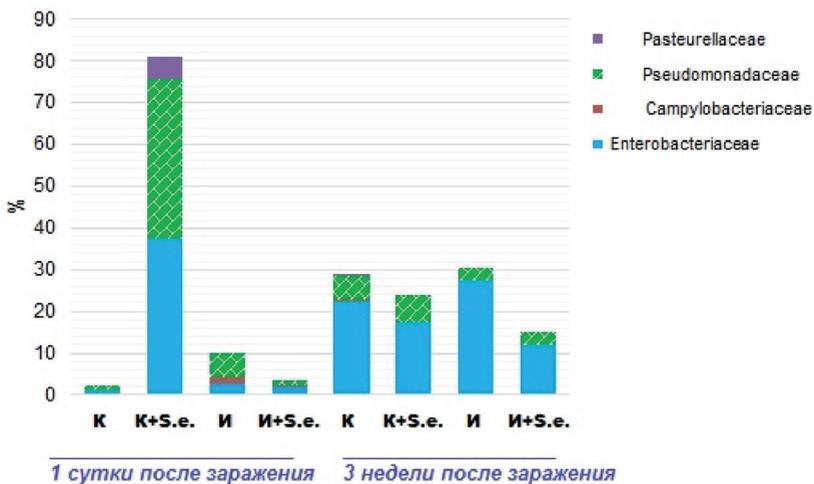
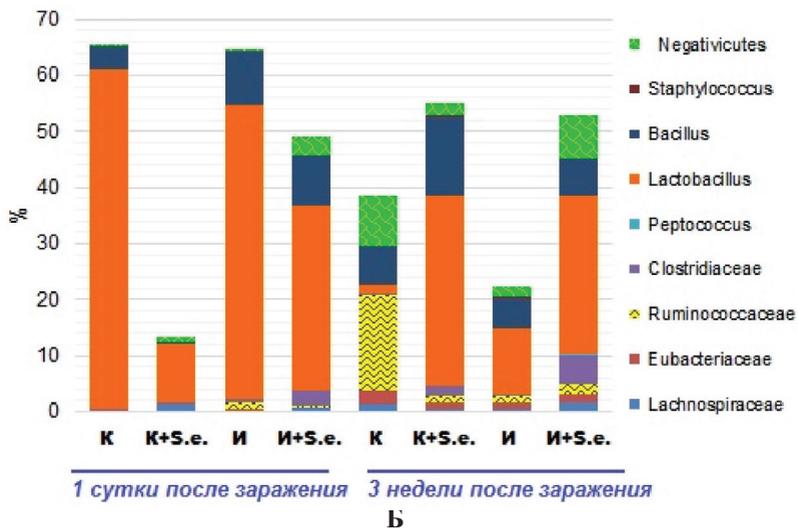


Рис. 2. Состав микробиоценоза слепых отростков (n=3) методом T-RFLP: А — представленность филумов и неидентифицированных бактерий, Б — таксоны филума Firmicutes, В — таксоны филума Proteobacteria; К — контроль без заражения, К + S.e. — контроль с заражением SE, И — Интебио, И + S.e. — Интебио с заражением SE

В целом бактериальное сообщество слепых отростков кишечника в рамках филума Firmicutes (рис. 2Б) через сутки после заражения SE было представлено следующими таксонами: семействами *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, родами *Lactobacillus*, *Bacillus*, порядком *Negativicutes*.

Изучение микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после заражения выявило обсеменение содержимого кишечника представителями родов *Peptococcus* и *Staphylococcus*.

Анализируя содержание микроорганизмов слепых отростков кишечника по вариантам следует отметить, что через сутки после инфицирования в контрольной группе происходило резкое падение численности представителей родов *Lactobacillus* ($p=0,006$) и *Bacillus* ($p=0,02$) по сравнению с вариантами без заражения. При этом в варианте с использованием кормовой добавки Интебио на фоне заражения резких отличий от других групп по содержанию таксонов филума Firmicutes обнаружено не было. Так, например, количество *Lactobacillus sp.* в контрольной группе без заражения составляло $60,5 \pm 2,20\%$, в контрольной группе с заражением — $10,7 \pm 0,41\%$, в варианте с применением кормовой добавки на фоне заражения — $32,9 \pm 1,47\%$.

Через три недели после инфицирования резких отличий между группами по содержанию микроорганизмов не наблюдалось. Исключение составляет контрольный вариант без заражения, где количество *Lactobacillus sp.* было крайне низким ($1,4 \pm 0,11\%$), тогда как содержание бактерий семейства *Ruminococcaceae* — высоким ($17,1 \pm 1,50\%$) по сравнению с другими вариантами. С возрастом содержание бактерий порядка *Negativicutes* во всех вариантах возрастало.

В основном микробное сообщество слепых отростков кишечника в рамках филума Proteobacteria через сутки (рис. 2В), а также через три недели после заражения SE было представлено бактериями семейств *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*. Исключение составляет контрольный вариант через сутки после заражения, где было детектировано присутствие представителей семейства *Pasteurellaceae* ($5,5 \pm 0,78\%$). Через сутки после инфицирования наблюдалось резкое возрастание в контрольном варианте с заражением численности бактерий семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*: в $28,8$ ($p=0,008$) и $40,9$ ($p=0,003$) раз соответственно по сравнению с контролем без инфицирования. Тем не менее в группе с применением Интебио на фоне заражения подобной ситуации не наблюдалось.

Изучение микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после заражения выявило увеличение содержания представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* во всех опытных и контрольных группах.

Расчет линейной корреляционной зависимости методом Пирсона (рис. 3) выявил, что в целом возрастание численности неидентифицированных бактерий в слепых отростках кишечника птиц имело обратную связь с увеличением численности бактерий семейств Enterobacteriaceae ($p=0,030$), Pseudomonadaceae ($p=0,009$), Pasteurellaceae ($p=0,024$) и филума Fusobacteria ($p=0,048$). Интересно, что увеличение содержания представителей рода Lactobacillus в слепых отростках кишечника кур имело обратную связь с возрастанием содержания бактерий семейств Lachnospiraceae ($p=0,007$) и Enterobacteriaceae ($p=0,005$). Возрастание представителей рода Bacillus в слепых отростках кишечника кур имело обратную связь с возрастанием Clostridium perfringens/C. noviy ($p=0,024$) и представителей семейства Pasteurellaceae ($p=0,011$). Возрастание численности представителей семейства Ruminococcaceae имело в слепых отростках кишечника прямую связь с увеличением содержания бактерий семейства Eubacteriaceae ($p=0,024$). Возрастание численности представителей рода Fusobacteria в слепых отростках кишечника кур имело прямую связь с увеличением содержания бактерий рода Staphylococcus ($p=0,004$).

Несмотря на то, что данные по результатам оценки продуктивности (табл. 3) были недостоверны, можно проследить тенденцию некоторого увеличения продуктивности у птицы, получавшей кормовую добавку Интебио в группе без заражения по сравнению с контролем, а также в варианте с инфицированием по сравнению с контролем.

Таблица 3. Показатели живой массы, г ($M \pm m$, $n=3$)

До заражения	Суточные цыплята	После заражения	1 сутки после заражения	3 недели после заражения
Контроль	38,1±1,9	Контроль без заражения	650,4±104,0	2294,0±184,0
		Контроль + SE	656,0±53,0	2004,6±233,0
Интебио	38,2±2,4	Интебио без заражения	743,8±54,0	2403,2±231,0
		Интебио + SE	720,3±81,0	1936,6±155,0

Стоит отметить, что расчет линейной корреляционной зависимости методом Пирсона выявил, что возрастание численности бактерий семейства Eubacteriaceae имело прямую связь ($r=0,87$) с увеличением продуктивности.

Обсуждение

Экспрессия генов, участвующих в иммунном ответе, при заражении SE и применении фитобиотика

Заражение сальмонеллой, так же как и применение фитобиотика, способствовало повышению уровня экспрессии генов, связанных с иммуни-

тетом, по отношению к контролю через сутки после заражения. Эфирные масла, входящие в состав фитобиотика, оказывали влияние на иммунную систему цыплят. Это может говорить об иммуномодулирующих свойствах добавки, поскольку она обладает способностью стимулировать иммунный ответ. Вероятно, высокий уровень экспрессии в группе, в рацион которой была введена добавка Интебио (без заражения), свидетельствует о более высоком уровне активации врожденного иммунитета. Об увеличении количества интерлейкинов и иммунных белков, таких как IL1 β , IL6, IL8, IL12, IL17, IL18, IL22, IL23, IFN γ и LITAF, после заражения цыплят сальмонеллой неоднократно сообщалось в других исследованиях (Berndt et al., 2007; Crhanova et al., 2011).

Ранее было продемонстрировано увеличение экспрессии *AvBD3* и *AvBD6* у птиц при заражении рядом патогенов (Zhao et al., 2001; van Dijk et al., 2007). Данные, полученные рядом исследователей, в значительной степени подтверждают роль β -дефензинов в качестве защитных молекул против кишечных патогенов (Hasenstein, Lamont, 2007; Mukhopadhyay et al., 2010). Некоторые исследователи предлагают использовать β -дефензины в качестве потенциального маркера против инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями (Mukhopadhyay et al., 2010).

Анализ экспрессии генов через три недели после заражения (у 43-суточной птицы) показал тенденцию к снижению уровня экспрессии генов, связанных с иммунитетом. При этом на фоне заражения отмечена более высокая активность экспрессии исследованных генов.

Через три недели после заражения на фоне применения Интебио наблюдалось снижение уровня экспрессии генов по сравнению с контролем при инфицировании сальмонеллой и без заражения. Это может свидетельствовать о более раннем подавлении воспалительной реакции вследствие нормализации состояния здоровья зараженной птицы, что косвенно подтверждается тенденцией увеличения продуктивности в группах с введением в корм Интебио.

Состав микробного сообщества слепых отростков кишечника при заражении SE и применении фитобиотика

Судя по значениям индексов биоразнообразия и количеству выявленных флотипов в слепых отростках, инфицирование SE привело к значительному снижению биоразнообразия микроорганизмов в контрольном варианте без добавок, что свидетельствует о дисбиотических нарушениях. Сходную картину наблюдал Liu с соавт. (Liu et al., 2017) при изучении методом секвенирования гена 16S рРНК сдвигов микробного сообщества в кишечнике цыплят, зараженных сальмонеллой, в ответ на

лечение энрофлоксацином в разных дозах (0; 0,1; 4 и 100 мг/кг массы тела). Инфицирование птицы сальмонеллой, так же как и применение антибиотика, приводило к снижению индекса Шеннона в среднем с 3,23 до 2,17. Исследование микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после инфицирования выявило общую тенденцию увеличения бактериального разнообразия с возрастом вне зависимости от вариантов. Сходные выводы были сделаны ранее Фисининым с соавт. (Фисинин и др., 2016) при изучении изменений бактериального сообщества в ЖКТ в онтогенезе.

Через сутки после инфицирования сальмонеллой в слепых отростках кишечника птиц контрольного варианта происходило резкое увеличение численности бактерий филума *Proteobacteria* на фоне падения содержания некультивируемых бактерий, представителей филумов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* по сравнению с вариантами без заражения. В группах без заражения (с введением кормовой добавки и без нее), а также в варианте с использованием кормовой добавки Интебио на фоне заражения численное преимущество имели бактерии *Firmicutes*. В целом бактериальное сообщество слепых отростков кишечника в рамках филума *Firmicutes* через сутки после заражения SE было представлено следующими таксонами: семействами *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, родами *Lactobacillus*, *Bacillus*, порядком *Negativicutes*. Изучение микробиоценоза в слепых отростках кишечника птиц через три недели после заражения выявило обсеменение содержимого кишечника представителями родов *Peptococcus* и *Staphylococcus*. Приведенные нами данные согласуются с результатами, полученными ранее (Lu et al., 2003; Józefiak et al., 2010; Singh et al., 2012). Так, Liu с соавт. (Liu et al., 2017) с применением метода секвенирования гена 16S рРНК показали, что в микробных сообществах кишечника доминировали представители филумов *Firmicutes* и *Proteobacteria*, которые составляли более 90% проанализированных последовательностей. В рамках филума *Firmicutes* были выявлены бактерии семейств *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и рода *Enterococcus*.

Тот факт, что через сутки после инфицирования сальмонеллой наблюдалось резкое возрастание в контрольном варианте с заражением численности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, представляется вполне логичным, поскольку SE входит в состав данного таксона и, вероятно, получила конкурентное преимущество в кишечнике. При этом через сутки после инфицирования в контрольной группе происходило резкое падение численности представителей родов *Lactobacillus* и *Bacillus* по сравнению с вариантами без заражения. Подобная картина свидетельствует о

серьезных дисбиотических нарушениях состава кишечной микрофлоры, поскольку бактерии данных таксонов продуцируют бактериостатические и бактерицидные вещества: органические кислоты, бактериоцины и др. (Svetoch et al., 2011; Dobson et al., 2012), ингибирующие патогенные для кур формы, такие как *E. coli*, *Salmonella* sp. (Hinton et al., 1992), *C. perfringens* (Murry et al., 2004; Teo et al., 2005), *Campylobacter jejuni* (Stern et al., 2006; Messaoudi et al., 2012), *L. monocytogenes* (Shin et al., 2008) и др. У здоровых птиц комменсальные бактериальные сообщества колонизируют ЖКТ путем адгезии, образуя защитный слой или биопленку, покрывающих поверхность слизистого эпителия. Этот слой, состоящий из разнообразных симбиотических микробных сообществ одновременно механически и функционально блокирует колонизацию кишечника патогенными микроорганизмами (Lan et al., 2005; Lawley, Walker, 2013), что носит название «конкурентное исключение» (Gabriel et al., 2006). При проникновении кишечных инфекционных микроорганизмов, обладающих мощнейшими факторами патогенности, происходит нарушение кишечного эпителиального барьера и резкое возрастание численности условно-патогенной и патогенной микрофлоры и снижение симбиотических микроорганизмов (Lan et al., 2005). Тот факт, что через три недели после инфицирования резких отличий между группами по содержанию микроорганизмов не наблюдалось, свидетельствует о нормализации состава микробиома слепых отростков кишечника в вариантах с заражением сальмонеллой.

Интересно, что в нашем эксперименте в группе с введением в корм фитобиотика Интебио на фоне заражения SE снижения биоразнообразия микрофлоры и других дисбиотических нарушений в слепых отростках кишечника детектировано не было. Это согласуется с приведенными выше данными о наблюдавшемся снижении уровня экспрессии генов через три недели после заражения на фоне применения Интебио по сравнению с контролем при инфицировании сальмонеллой и без заражения. Таким образом, вывод о более раннем подавлении воспалительной реакции вследствие нормализации состояния здоровья зараженной птицы находит еще одно подтверждение. Вероятно, наблюдаемый эффект связан с иммуномодулирующими свойствами эфирных масел в составе Интебио, выражающемся, в том числе, в повышении уровня экспрессии некоторых генов иммунитета. Детектированные изменения в уровне экспрессии генов иммунитета и восстановление состава микрофлоры могли иметь тенденцию способствовать росту продуктивности в вариантах с применением кормовой добавки. Ранее Liu с соавт. (Liu et al., 2017) отметили положительное влияние защитных эфирных

масел на микрофлору кишечника цыплят кросса Cobb 500. Так, введение в рацион защитных эфирных масел приводило к доминированию численности бактерий рода *Lactobacillus*, а также способствовало увеличению высоты ворсинок и глубины крипт тонкого кишечника по сравнению с контролем без добавок. Сходные результаты были получены также рядом других авторов (Betancourt et al., 2014; Gaucher et al., 2015; Kelly et al., 2017).

Авторам настоящей статьи представляется логичным, что возрастание численности неидентифицированных бактерий в слепых отростках кишечника птиц имело обратную связь с увеличением численности бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae* и филума *Fusobacteria*. Среди вышеперечисленных таксонов нередко встречаются возбудители заболеваний, к которым могут быть восприимчивы куры (например, колибактериоз, псевдомоноз и пастереллез; Poultry Diseases, 2007) и млекопитающие (Дорош, 2007). Это указывает на возможную антимикробную активность у пула детектированных фило типов некультивируемых бактерий в отношении патогенных форм, что предоставляло им конкурентное преимущество в условиях кишечника. Полученные данные представляют высокую научную ценность, поскольку, некультивируемые микроорганизмы невозможно выявить и изучить с помощью традиционных методов микробиологии — культивирования на питательных средах, в связи с этим их метаболические пути и роль для макроорганизма не ясны.

Интересно и дискуссионно также заметить, что увеличение содержания представителей рода *Lactobacillus* в слепых отростках кишечника кур имело обратную связь с возрастанием содержания бактерий семейств *Lachnospiraceae* и *Enterobacteriaceae*. Дело в том, что представители рода *Lactobacillus* синтезируют в качестве основного продукта метаболизма лактат, снижающий уровень pH химуса. Как известно, представители семейств *Lachnospiraceae* (Bacteria..., 2006) и *Enterobacteriaceae* (Прокариоты..., 2005) крайне чувствительны к падению уровня pH.

Закономерной выглядит еще одна полученная зависимость, в соответствии с которой возрастание представителей рода *Bacillus* в слепых отростках кишечника кур имело обратную связь с возрастанием *C. perfringens*/*C. noviy* и представителей семейства *Pasteurellaceae* (при $p \leq 0,05$), среди которых могут встречаться патогенные микроорганизмы, к которым восприимчивы куры. Бактерии рода *Bacillus* обладают способностью к синтезу широкого набора бактериоцинов (Смирнов, 1982), эффективно угнетающих развитие патогенных бактерий (Guo et al., 2006).

Возрастание численности представителей семейства *Ruminococcaceae* имело в слепых отростках кишечника прямую связь с увеличением содержания бактерий семейства *Eubacteriaceae* (при $p \leq 0,05$). Вероятно, это связано с тем, что оба данных таксона имеют сходные пути метаболизма (вырабатывают целлюлазы), в связи с чем проявляют сходные пищевые потребности, а также требования к уровню рН.

Возрастание численности представителей рода *Fusobacteria* в слепых отростках кишечника кур имело прямую связь с увеличением содержания бактерий рода *Staphylococcus* (при $p \leq 0,05$). Среди данных таксонов нередко встречаются патогенные для млекопитающих и птиц формы (Poultry Diseases, 2007; Дорош, 2007), увеличение содержания которых в кишечнике наблюдается при дисбиотических сдвигах микробиологического равновесия (Ильина и др., 2015; Егорова и др., 2016; Фисинин и др., 2016).

Расчет линейной корреляционной зависимости методом Пирсона выявил, что возрастание численности бактерий семейства *Eubacteriaceae* имело прямую связь ($r=0,87$) с увеличением продуктивности птицы ($p \leq 0,05$). Полученная взаимосвязь представляется закономерной, поскольку представители семейства *Eubacteriaceae* продуцируют в процессе метаболизма целлюлазы (Тараканов, 2006), которые катализируют гидролиз $\beta(1,4)$ -гликозидных связей в целлюлозе, поступающей с кормами, с образованием глюкозы или целлобиозы. Как известно, углеводы, входящие в состав компонентов корма, представлены в основном некрахмалистыми полисахаридами (НПС) — целлюлозой, гемицеллюлозой, пектиновыми веществами и лигнином. НПС, являясь основными компонентами растительных клеточных стенок, представляют естественный барьер на пути действия пищеварительных ферментов. Обладая способностью связывать воду, растворимые НПС повышают вязкость химуса, а нерастворимые образуют полимерный матрикс, препятствующий равномерному перемешиванию пищеварительных масс и играющий роль своеобразной сети, в которую попадают крупные молекулы, в результате чего снижается интенсивность пристеночного пищеварения. Кроме того, при замедлении продвижения кишечного содержимого, в нем возрастает количество патогенной и другой нежелательной микрофлоры. При этом у птиц возникает водянистый помет, что приводит к ухудшению санитарно-гигиенического состояния мест содержания. Одной из особенностей ЖКТ птиц является отсутствие собственных ферментов, ответственных за расщепление клетчатки и других НПС. Вследствие этого переваривание данных веществ происходит исключительно с участием микроорганизмов, в том числе и представителей

семейства *Eubacteriaceae*, содержащихся в слепых отростках ЖКТ. В связи с этим сопутствующее увеличение продуктивности представляется достаточно логичным.

Заключение

Проведенные эксперименты подтвердили факт того, что заражение птицы SE приводит к активации экспрессии некоторых генов иммунитета. На ранних стадиях заражения введение в рацион фитобиотика Интебио на основе эфирных масел способствовало усилению иммунного ответа у птиц в ответ на заражение сальмонеллой. Впоследствии в вариантах с применением Интебио происходило более раннее подавление воспалительной реакции. Заражение сальмонеллой вызывало резкие дисбиотические нарушения состава микрофлоры слепых отростков кишечника на ранних стадиях после инфицирования. В группах с введением в корм фитобиотика Интебио на фоне заражения SE снижения биоразнообразия микрофлоры и других дисбиотических нарушений в слепых отростках кишечника детектировано не было. Нормализация состава микрофлоры и активация иммунитета у зараженной птицы в группах с введением в корм Интебио способствовали увеличению продуктивности. Таким образом, опыт применения кормовой добавки Интебио в качестве иммуномодулятора и препарата с фитобиотической активностью, в том числе на фоне искусственного заражения птицы опасным патогеном, оказался весьма успешным.

Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология. М.: Изд-во МГУ, 2012. 474 с.

Грозина А.А. Влияние состава рациона на микробиологические показатели желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров при скармливании препаратов Стафак-110 и Целлобактерин-Т: дис. ... канд. биол. наук. М., 2016. 181 с.

Дорош М.В. Болезни крупного рогатого скота. М.: Вече, 2007. 160 с.

Егорова Т.А., Ленкова Т.Н., Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Никонов И.Н., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Грозина А.А., Манукян В.А., Фисинин В.И., Егоров И.А. Влияние пробиотиков на основе

Saccharomyces sp. и *Bacillus subtilis* на бактериальное сообщество слепых отростков кишечника и продуктивность цыплят-бройлеров // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 6. С. 8 91–902.

Ильина Л.А., Ёылдырым 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. Т.50. № 6. С. 8 17–824.

Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях / Гос. Комиссия Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам, ВПНО «Союзптицепром», НПО птицеперерабатывающей промышленности «Комплекс». М., 1990. 96 с.

Крюков В.С., Глебова И.В. Антибактериальное действие эфирных масел лекарственных растений (обзор) // Проблемы биологии продуктивных животных. 2017. № 3. С. 5 –25.

Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биолог. спец. высш. учеб. заведений. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

Прокариоты // Современная микробиология / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса и Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1. 656 с.

Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии продуценты биологически активных веществ. К.: Наукова думка, 1982. 278 с.

Спиридонов А.Н., Петрова О.Н., Ирза В.Н., Караулов А.К., Никифоров В.В. Об эпизоотической ситуации по инфекционным болезням птиц на основе анализа данных ветеринарной отчетности // Ветеринария сегодня. 2015. № 4. С. 1 8–28.

Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. М.: Научный мир, 2006. 188 с.

Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Мелешко Н.А., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Козлова А.А., Нифатов А.В. Влияние *Bacillus subtilis* на микробное сообщество рубца и его членов, имеющих высокие коэффициенты корреляции с показателями пищеварения, роста и развития хозяина // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 4 56–463.

Фисинин В.И., Сурай П. Кишечный иммунитет у птиц: факты и размышления (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 4. С. 3–25.

Фисинин В.И., Егоров И.А., Драганов И.Ф. Кормление сельскохозяйственной птицы: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 337 с.

Фисинин В.И., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Ильина Л.А., Ыылдырым Е.А., Филиппова В.А., Новикова Н.И., Грозина А.А., Егорова Т.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Егоров И.А. Изменение бактериального сообщества в желудочно-кишечном тракте кур в онтогенезе // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 6. С. 883–890.

Черкасский Б.Л., Рожнова С.Ш., Тендетник Ю.Я., Антонов Б.И., Поповцев В.В., Шустер Б.Ю., Киржаев Ф.С. Лабораторная диагностика сальмонеллезов человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды. Методические указания / Отв. за вып. С.Ш. Рожнова и В.В. Поповцев. М.: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Минздрава СССР, 1990. 59 с.

Adegunloye D.V. Microorganism associated with poultry faeces // Journal of Food, Agriculture and Environment. 2006. Vol. 4. No. 1. P. 41–42.

Adil S., Magray S.N. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: a review // Journal of Animal and Veterinary Advances. 2012. Vol. 1. No. 6. P. 873–877.

Akbari M.R., Haghghi H.R., Chambers J.R., Brisbin J., Read L.R., Sharif S. Expression of antimicrobial peptides in cecal tonsils of chickens treated with probiotics and infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // Clinical and Vaccine Immunology. 2008. Vol. 15. No. 1. P. 1689–1693.

Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria // The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria / Editor-in-chief: M. Dworkin; Editors: S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. 3rd edn. New York, NY, USA: Springer, 2006. Vol. 4. 1140 p.

Barkova O.Y., Laptev G.Y., Kochish I.I., Romanov M.N., Shevkhezhev A.F. Overview of genes associated with egg productivity and resistance of domestic hen ontogeny // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2017. Vol. 8. No. 6. P. 638–644.

Berndt A., Wilhelm A., Jugert C., Pieper J., Sachse K., Methner U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness // Infection and Immunity. 2007. Vol. 75. No. 12. P. 5993–6007.

Betancourt L., Phandanouvong V., Ariza-Nieto C., Hume M., Van Kley A.M., Nalian A., Rodriguez F., Nisbet D., Afanador-Téllez G. Effect of *Origanum* chemotypes on broiler intestinal bacteria // Poultry Science. 2014. Vol. 93. No. 10. P. 2526–2535.

Brenes A., Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action // *Animal Feed Science and Technology*. 2010. Vol. 1 58. No. 1 –2. P. 1 –14.

Crhanova M., Hradecka H., Faldynova M., Matulova M., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection // *Infection and Immunity*. 2011. Vol. 7 9. No. 7. P. 2 755–2763.

Croswell A., Amir E., Tegatz P., Barman M., Salzman N.H. Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection // *Infection and Immunity*. 2009. Vol. 7 7. No. 7. P. 2 741–2753.

Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? // *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 7 8. No. 1. P. 1 –6.

El Khoury R., Atoui A., Verheecke C., Maroun R., El Khoury A., Mathieu F. Essential oils modulate gene expression and Ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* // *Toxins (Basel)*. 2016. Vol. 8. No. 8. P. 1 35–148

Esmailipour O., Moravej H., Shivazad M., Rezaian M., Aminzadeh S., Van Krimpen M. Effects of diet acidification and xylanase supplementation on performance, nutrient digestibility, duodenal histology and gut microflora of broilers fed wheat based diet // *British Poultry Science*. 2012. Vol. 5 3. No. 2. P. 2 35–244.

Gabriel I., Lessire M., Mallet S., Guillot J.F. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry // *World's Poultry Science Journal*. 2006. Vol. 62. No. 3. P. 4 99–511.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // *Nature Reviews Immunology*. 2003. Vol. 3. No. 9. P. 710–720.

Gaucher M.L., Quessy S., Letellier A., Arsenaault J., Boulianne M. Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level // *Poultry Science*. 2015. Vol. 94. No. 8. P. 1791–1801.

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. Vol. 9. No. 2. P. 139–146.

Hammer Ø., Harper D.A.T, Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. Vol. 4. No. 1. Art. No. 4.

Hasenstein J., Lamont S.J. Chicken gallinacin gene cluster associated with *Salmonella* colonization in two advanced intercross lines // *Animal Industry*

Report. Ames, IA, USA: Iowa State University, 2007. AS 653, ASL R2215.

Hinton A., Corrier D.E., Deloach J.R. In vitro inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* 0157:H7 by an anaerobic gram-positive coccus isolated from the cecal contents of adult chickens // *Journal of Food Protection*. 1992. Vol. 55. No. 3. P. 162–166.

Iliina L.A., Yildirim E.A., Nikonov I.N., Filippova V.A., Laptev G.Y., Novikova N.I., Grozina A.A., Lenkova T.N., Manukyan V.A., Egorov I.A., Fisinin V.I. Metagenomic bacterial community profiles of chicken embryo gastrointestinal tract by using T-RFLP analysis // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016. Vol. 466. No. 1. P. 47–51.

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. Vol. 46. No. 4. P. 485–493.

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. Vol. 134. No. 3–4. P. 304–315.

Józefiak D., Rutkowski A., Kaczmarek S., Jensen B., Engberg R., Højberg O. Effect of β -glucanase and xylanase supplementation of barley and rye-based diets on caecal microbiota of broiler chickens // *British Poultry Science*. 2010. Vol. 51. No. 4. P. 546–557.

Kelly C., Gundogdu O., Pircalabioru G., Cean A., Scates P., Linton M., Pinkerton L., Magowan E., Stef L., Simiz E., et al. The *in vitro* and *in vivo* effect of carvacrol in preventing *Campylobacter* infection, colonisation and in improving productivity of chicken broilers // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2017. Vol. 14. No. 6. P. 341–349.

Klasing K.C. Nutrition and the immune system // *British Poultry Science*. 2007. Vol. 48. No. 5. P. 525–537.

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. Vol. 61. No. 1. P. 95–104.

Lawley T.D., Walker A.W. Intestinal colonization resistance // *Immunology*. 2013. Vol. 138. No. 1. P. 1–11.

Lee M.O., Romanov M.N., Plemyashov K.V., Dementieva N.V., Mitrofanova O.V., Barkova, O.Y., Womack J.E. Haplotype structure and copy number polymorphism of the beta-defensin 7 genes in diverse chicken breeds // *Animal Genetics*. 2017. Vol. 48. No. 4. P. 490–492.

Li F., Hullar M.A., Lampe J.W. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota // *Journal of Microbiological Methods*. 2007. Vol. 68. No. 9. P. 303–311.

Liu Y., Yang X., Xin H., Chen S., Duan Y. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers // *Animal Science Journal*. 2017. Vol. 2. No. 9. P. 1414–1424.

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method // *Methods*. 2001. Vol. 25. No. 4. P. 402–408.

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. Vol. 69. No. 11. P. 6816–6824.

Lynn D.J., Higgs R., Lloyd A.T., O'Farrelly C., Hervé-Grépinet V., Nys Y., Brinkman F.S., Yu P.L., Soulier A., Kaiser P., Zhang G., Lehrer R.I. Avian beta-defensin nomenclature: A community proposed update // *Immunology Letters*. 2007. Vol. 110. No. 1. P. 86–89.

Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H., Yousef A., Wang H.H., Witum T.E., Bakaletz L.O. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes // *FEMS Microbiology Letters*. 2006. Vol. 255. No. 2. P. 328.

Matulova M., Rajova J., Vlasatikova L., Volf J., Stepanova H., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I. Characterization of chicken spleen transcriptome after infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7. No. 10. P. e48101.

McDougald L.R. Protozoal infections // *Diseases of Poultry* / Ed. by Y.M. Saif. 11th rev. edn. Ames, IA, USA: Iowa State University Press, 2003. P. 973–974.

Menendez A., Finlay B.B. Defensins in the immunology of bacterial infections // *Current Opinion in Immunology*. 2007. Vol. 19. No. 4. P. 385–391.

Messaoudi S., Kergourlay G., Dalgarrondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prévost H., Pilet M.F., Chobert J.M., Manai M., Dousset X. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51 // *Food Microbiology*. 2012. Vol. 32. No. 1. P. 129–134.

Mughini-Gras L., Enserink R., Friesema I., Heck M., Van Duynhoven Y., Van Pelt W. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. No. 2. P. e87933.

Mukhopadhyay C.S., Kumar R., Brah G.S. Gallinacin and fowlicidin: two promising antimicrobial peptides in chickens—a review // *Veterinary World*. 2010. Vol. 3. No. 6. P. 297–300.

Murry A. Jr., Hinton A., Morrison H. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* // International Journal of Poultry Science. 2004. Vol. 3. No. 9. P. 603–607.

Nikonov I.N., Kochish I.I., Ilina L.A., Romanov M.N., Shevkhezhev A.F. Microbiota in the intestines of cross chick Lohmann Brown in ontogeny // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2017. Vol. 8. No. 6. P. 645–654.

Poultry Diseases / Ed. by M. Pattison, J.M. Bradbury and D. Alexander. 6th edn. Edinburgh, UK: W.B. Saunders Ltd., 2007. 632 p.

Reynolds D.L. Multicausal enteric diseases // *Diseases of Poultry* / Ed. by Y.M. Saif. 11th rev. edn. Ames, IA, USA: Iowa State University Press, 2003. P. 1169–1171.

Sekirov I., Tam N.M., Jogova M., Robertson M.L., Li Y., Lupp C., Finlay B.B. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection // Infection and Immunity. 2008. Vol. 76. No. 10. P. 4726–4736.

Seviour R., Nielsen P.H. Microbial Ecology of Activated Sludge. London, UK: IWA Publishing, 2010. 688 p.

Shin M., Han S., Ji A., Kim K., Lee W. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use // Journal of Applied Microbiology. 2008. Vol. 105. No. 6. P. 2203–2212.

Singh K.M., Shah T., Deshpande S., Jakhesara S.J., Koringa P.G., Rank D.N., Joshi C.G., Jakhesara S., Joshi C. 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. Vol. 39. No. 12. P. 10595–10602.

Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease // Applied Microbiology and Biotechnology. 2014. Vol. 98. No. 10. P. 4301–4310.

Stern N.J., Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Pokhilenko V.D., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Seal B.S. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006. Vol. 50. No. 9. P. 3111–3116.

Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Levchuk V.P., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Stepanshin J., Dyatlov I., Seal B.S., Stern N.J. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of

its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum // Applied and Environmental Microbiology. 2011. Vol. 77. No. 8. P. 2749–2754.

Teo A.Y.L., Tan H.M. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens // Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71. No. 8. P. 4185–4190.

van Dijk A., Veldhuizen E.J., Kalkhove S.I., Tjeerdsma-van Bokhoven J.L., Romijn R.A., Haagsman 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. Vol. 51. No. 3. P. 912–922.

Wigley P. *Salmonella enterica* in the chicken: how it has helped our understanding of immunology in a non-biomedical model species // Frontiers in Immunology. 2014. Vol. 5. P. 482.

Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry // Journal of Animal Science. 2008. Vol. 86. Suppl. 14. P. E140–E148.

Yang C., Chowdhury M.A.K., Hou Y., Gong J. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application // Pathogens. 2015. Vol. 4. No. 1. P. 137–156.

Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J.J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal // Trends in Immunology. 2002. Vol. 23. No. 6. P. 291–296.

Zeka F., Vanderheyden K., De Smet E., Cuvelier C.A., Mestdagh P., Vandesompele J. Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. Art. No. 21418.

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. Vol. 6. No. 1. P. 7.

Zhao C., Nguyen T., Liu L., Sacco R.E., Brogden K.A., Lehrer R.I. Gallinacin-3, an inducible epithelial β -defensin in the chicken // Infection and Immunity. 2001. Vol. 69. No. 4. P. 2684–2691.

Development of modern biotechnologies for evaluating gene expression in connection with disease resistance and productivity in poultry

Romanov M.N.,^{1,2} Laptev G.Yu.,³ Filippova V.A.,³ Yildirim E.A.,³ Ilina L.A.,³ Kochish I.I.,¹ Dubrovin A.V.,³ Novikova N.I.,³ Dunyashev T.P.,³ Novikova O.B.,⁴ Dmitrieva M.E.,⁴ Smolensky V.I.,¹ Surai P.F.,^{1,5,6,7}

¹ K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

² University of Kent, Canterbury, UK;

³ OOO BIOTROF+, St Petersburg, Russia;

⁴ All-Russian Veterinary Research Institute of Poultry Science—Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Centre ‘All-Russian Poultry Research and Technological Institute’ of the Russian Academy of Sciences, Lomonosov, St. Petersburg, Russia;

⁵ Szent Istvan University, Gödöllo, Hungary;

⁶ Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria;

⁷ St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia.

Abstract

The aim of this study was to examine the expression of immunity genes as well as the cecal bacterial profiles of chicks when infected with a strain of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE). The effectiveness of the phyto-biotic Intebio based on essential oils was also investigated. In general, *Salmonella* infection led to an increase in the expression level of most of the studied immunity genes. The addition of Intebio into the feed contributed to an increase in the expression of interleukin genes as compared with the control in birds both challenged with SE and non-challenged. In 3 weeks after infection, a decrease in the expression level of these genes or the same expression level as compared with the control was shown. A study of the cecal microbiological profiles of birds using T-RFLP in one day after infection revealed that infection of birds with SE led to a significant reduction in the biodiversity of microorganisms in the group without additives. At the same time, the content of bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bacillus* fell sharply, while the microorganisms of the *Enterobacteriaceae* family increased. In the group fed the phyto-biotic and challenged with SE, a pronounced change in the composition of the microflora was not observed. The study of microbiocenosis in the cecum of birds in three weeks after infection revealed a general tendency to increase bacterial diversity with age, regardless of the treatments. The data obtained indicate that infection with SE leads to activation of the expression of certain immunity genes, and also causes dysbiotic disturbances in the composition of the intestinal microflora. In the early stages of infection, the introduction of the phyto-biotic into the diet contributed to the enhancement of the immune response in birds due to SE. Subsequently, in birds fed Intebio, an earlier suppression of the inflammatory reaction occurred. Thus, the experiment of using the Intebio feed additive as an immunomodulator and a drug

with phytobiotic activity, when artificially challenging birds with a dangerous pathogen, was successful.

Key words: gene expression, RT-PCR, intestine, microbiome, T-RFLP analysis, poultry, chicks

Пути поддержания оптимального редокс-баланса в кишечнике птиц: проблемы и решения

Сурай П.Ф.,^{1, 2, 3, 4} Кочиш И.И.,⁴ Фисинин В.И.,⁵ Никонов И.Н.,^{4, 5} Романов М.Н.^{4, 6}

¹ Университет Святого Иштвана, Гёдёллэ, Венгрия;

² Тракийский Университет, Стара Загора, Болгария;

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

⁴ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

⁵ ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Московская обл., Россия;

⁶ Университет Кента, Кентербери, Великобритания.

E-mail: psurai@feedfood.co.uk

Аннотация

В промышленном птицеводстве важную роль здоровья кишечника птиц трудно переоценить, и таким образом поддержание оптимального редокс-баланса в кишечнике является приоритетным направлением исследований в птицеводческой науке. С одной стороны, редокс-баланс в кишечнике является ключевым моментом в поддержании иммунокомпетентности, включая иммунитет кишечника. С другой стороны, оптимальный редокс-баланс в микробиоте отвечает за защиту против патогенов и поддерживает высокую перевариваемость питательных веществ в кишечнике. В целом расшифровка молекулярных механизмов взаимодействия между редокс-балансом, витагенами и микробиотой в кишечнике позволит ответить на фундаментальные вопросы, связанные с проблемами со здоровьем кишечника (энтеритами), возникающими в связи с запрещением применения кормовых антибиотиков в птицеводстве.

Ключевые слова: витагены, кишечник, окислительный стресс, микробиота, сельскохозяйственная птица

Введение

Современное птицеводство развивается очень быстро благодаря значительным успехам генетиков, селекционеров и специалистов по кормлению птицы. Например, сегодняшний бройлер для достижения товарной массы убоя потребляет в три раза меньше корма, чем цыпленок, выращенный в 1950-х годах (Havenstein et al., 2003). При этом среднесуточный привес в 70 граммов при конверсии ниже 1,6 уже не за горами. В то же время все больше и больше вопросов возникает в связи со здоровьем птицы, включая ее биологическую защиту, с одновременным усилением внимания к безопасности продуктов питания. Например, отказ от кормовых антибиотиков связан с проблемами поддержания здоровья кишечника и предотвращения энтеритов птицы. С другой стороны, иммуносупрессия и слабый иммунитет в целом являются важнейшими факторами, связанными с распространением птичьего гриппа и других заболеваний. Проблемы попадания сальмонеллы и кампилобактера в продукты птицеводства до настоящего времени в полной мере не решены.

Таким образом, в последние годы все больше внимания уделяется функционированию кишечника птиц и два вопроса являются краеугольными камнями в решении данной проблемы. Первый — это так называемый редокс-баланс в кишечнике, который во многом определяет эффективность кишечного иммунитета и в целом целостность кишечника. С другой стороны, изучение взаимодействия редокс-баланса и микробиоты в кишечнике птиц в рамках поддержания ее здоровья и продуктивности стало поистине научной революцией, которая обогатила птицеводов и поставила множество вопросов, которые ожидают своего решения.

Стрессы и адаптация к ним в современном птицеводстве

Исследованиями последних двух десятилетий убедительно доказано, что большинство стрессов птицы, независимо от источника стресса, связаны с дисбалансом образования и детоксикации свободных радикалов (Surai, 2018; Surai et al., 2019). Таким образом, на молекулярном уровне окислительный стресс рассматривается в качестве ключевого звена отрицательных последствий кормовых, средовых, технологических и биологических/внутренних стрессов в современном птицеводстве (Surai, Fisinin, 2016a,b). При этом было доказано, что адаптация к стрессам осуществляется на уровне генов, и такие гены получили название *витагенов*. Наши исследования за последние десять лет позволили успешно перенести концепцию ви-

тагенов из медицины в птицеводство и доказать ее практическую эффективность (Surai, Fisinin, 2016с; Surai et al., 2017, 2019).

Таким образом, активация витагенов рассматривается в качестве одного из важнейших подходов к повышению устойчивости сельскохозяйственной птицы к различным стрессовым ситуациям. Это касается выращивания бройлеров, где стрессы начинаются от вывода молодняка и его посадки в помещение для выращивания и продолжаются до предубойного стресса. При выращивании ремонтного молодняка к вышеупомянутым стрессам добавляется бонитировка и сортировка птицы, ограниченное кормление, перевод ее в родительское стадо и т.д. Что касается родительского стада, то стрессовые ситуации связаны прежде всего с высокой продуктивностью, когда печень работает на пределе своих возможностей, чтобы обеспечить эффективное формирование яйца (желтка). При этом добавляются различные технологические стрессы, связанные с особенностями сбора, сортировки, транспортировки и фумигации инкубационных яиц. Успешное использование витаген-активирующей добавки (Меджик Антистресс Микс/PerforMax) на ряде передовых птицеводческих предприятий России (Shatskikh et al., 2015; Шацких и др., 2016; Григорьева и др., 2017), а также на предприятиях ближнего и дальнего зарубежья подтвердило правильность ранее сделанных выводов о возможности модуляции витагенов кормовым путем.

Следующий этап данной работы направлен на понимание роли витагенов в желудочно-кишечном тракте и на расшифровку молекулярных механизмов взаимодействия микробиоты кишечника с витагенами в рамках адаптации к различным стрессам промышленного производства яиц и мяса птицы.

Редокс-баланс в кишечнике птиц

В течение последних двадцати лет расшифровка механизмов поддержания так называемого редокс-баланса (баланса между антиоксидантами и прооксидантами) в кишечнике человека и животных, включая сельскохозяйственную птицу, являлась важнейшим направлением биологических, медицинских и ветеринарных исследований (Surai et al., 2003, 2004; Surai, Fisinin, 2015; Surai, 2018). Важнейшие нутриенты, включая биологически активные вещества, и различные вещества, обладающие токсическим действием, например, окисленные жиры или остатки микотоксинов, встречаются в кишечнике в процессе пищеварения. При этом главная задача кишечника заключается в переваривании и всасывании питательных веществ и извлечении энергии из кормовых

ингредиентов. В свою очередь, эффективность переваривания и всасывания различных нутриентов во многом определяется структурной целостностью кишечника, включая ворсинки и защитные механизмы слизистой оболочки кишечника.

В целом кишечник представляет собой достаточно сложно устроенную систему, которая, с одной стороны, характеризуется набором защитных механизмов (слизь, иммунитет, перистальтика, микробиота), способствующих поддержанию его целостности. С другой стороны, как упомянуто выше, токсические вещества, обладающие прооксидантными свойствами и попадающие с кормом, могут вызывать как прямое нарушение структуры кишечника (например, микотоксины ДОН или Т-2 токсин), так и опосредованное нарушение за счет активации воспаления, которое, в свою очередь, вызывает субклинические или клинические энтериты. Патогенная микрофлора в кишечнике также способствует воспалению. Таким образом, использование различных кормовых добавок, способствующих поддержанию интактной структуры кишечника, уже нашло свое применение в современном птицеводстве.

В стрессовых ситуациях тонкий кишечник страдает в первую очередь. С точки зрения редокс-баланса, наши исследования показали, что антиоксидантная активность жирорастворимой фракции слизистой кишечника цыплят была самой высокой в 12-перстной кишке цыплят с последующим ее снижением в других отделах кишечника по направлению к толстому кишечнику. Интересно отметить, что антиоксидантная активность водорастворимой фракции слизистой кишечника была более чем в 10 раз большей, чем ее жирорастворимая фракция, и практически не различалась в разных отделах кишечника. Высокая концентрация витамина Е и каротиноидов была обнаружена в 12-перстной и тощей кишке с последующим снижением в других отделах кишечника (McLean et al., 2005).

При исследовании важнейшего фермента антиоксидантной защиты — супероксиддисмутазы (СОД) в кишечнике птиц было установлено, что в соответствии с уменьшением активности этого фермента участки кишечника можно расположить следующим образом: 12-перстная кишка > тощая кишка = подвздошная кишка > слепые отростки > толстый кишечник. При этом активность СОД в 12-перстной кишке была на 40% выше, чем в подвздошной или тощей кишках. В то же время активность СОД в слепых отростках была на 24% ниже, чем в подвздошной или тощей кишках. Интересно отметить, что наивысшим уровнем перекисления липидов характеризовалась слепая кишка и по уменьшению количества образовавшихся липидных перекисей отделы кишечника птицы можно расположить следу-

ющим образом: тощая кишка > 12-перстная кишка > подвздошная кишка > слепые отростки = толстый кишечник (Сурай и др., 2018).

Кроме того, было установлено, что активность СОД в подвздошной кишке цыплят была выше, чем в тощей кишке и в обоих отделах она снижалась в результате иммунологического стресса, вызванного обработкой птицы липополисахаридами (LPS). При этом активность СОД в подвздошной кишке достоверно снижалась в результате инфекции, вызванной *Salmonella Pullorum* (см. Сурай и др., 2018). Следует подчеркнуть, что СОД является одним из важнейших витагенов, ответственных за адаптацию к стрессам (Surai, 2016).

Необходимо также отметить важную роль и других витагенов в кишечнике. Например, в условиях теплового стресса у цыплят в тощей и подвздошной кишке экспрессия витагена HSP70 повысилась, и ответ на стресс со стороны HSP70 в подвздошной кишке был более выраженным, чем в тощей кишке (Varasteh et al., 2015). В недавней обзорной статье (Lallès, 2016) было отмечено, что HSP70 в кишечнике регулирует много различных процессов, включая пролиферацию клеток и их апоптоз (запрограммированную клеточную смерть), а также кишечный иммунитет, и в целом участвует в поддержании редокс-баланса в кишечнике, который во многом определяет процессы окисления и воспалительные процессы. К тому же HSP70 регулирует барьерную функцию кишечника путем воздействия на специфические белки плотного клеточного контакта, включая окклюдин, а также путем снижения окислительного стресса и воспаления. Авторы также отметили, что обнаруживается высокая экспрессия HSP70 в толстом кишечнике и низкая экспрессия в тонком кишечнике грызунов. При этом считается, что кишечная микробиота во многом отвечает за активацию данного витагена.

В целом можно заключить, что HSP70 играет решающую роль в защите целостности кишечника птиц в условиях стресса и регуляция активности этого витагена кормовым путем или опосредовано через микробиоту заслуживает дополнительного внимания. В нашем недавнем обзоре, посвященном белкам теплового шока (Surai, Kochish, 2017), были приведены литературные данные о положительной корреляции между HSP70 и активностью пищеварительных ферментов у бройлеров. При этом индукция HSP70 у цыплят защищала слизистую кишечника от повреждений в условиях теплового стресса и одновременно повышала антиоксидантную защиту (например, активность СОД) и снижала образование липидных перекисей. Таким образом, защитная роль HSP70 в кишечнике птиц особенно проявляется в различных стресс-условиях, включая тепловой стресс.

Факторы транскрипции и их роль в кишечнике

При рассмотрении взаимодействия микробиоты с витагенами дополнительного внимания заслуживают исследования, посвященные факторам транскрипции, включая Nrf2 и NF-κB. Следует подчеркнуть, что редокс-регуляция экспрессии генов является фундаментальным регуляторным механизмом в биологии клетки, действующим на уровне ее сигнальной системы. Несмотря на то, что свободные радикалы повреждают биологические молекулы, низкие концентрации этих активных молекул-«убийц» рассматриваются сегодня в качестве сигнальных молекул, включающих клеточную адаптацию к стрессу. В целом, в условиях адаптации к стрессу, антиоксидантная система организма, отдельной ткани или клетки регулируется различными факторами транскрипции, включая Keap1/Nrf2, NF-κB, PPARs, MAPK, AP1 и др. При этом в последнее время все больше внимания уделяется двум таким факторам, а именно Nrf2 и NF-κB (Surai et al., 2019). Известно, что фактор транскрипции Nrf2 является редокс-чувствительным мастером-регулятором антиоксидантной системы в критических условиях стресса. В частности, данный фактор отвечает за активацию большого числа генов, участвующих в антиоксидантной защите и адаптации к стрессу как в печени, так и в тонком кишечнике.

Интересно отметить, что в нормальных физиологических условиях данный фактор находится в цитоплазме в связанном состоянии со специальным белком-репрессором (Keap1) и постоянно подвергается деградациии в протеасомах с периодом полураспада около 20 мин. В условиях стресса происходит окисление сульфгидрильных групп в белке-репрессоре, он меняет структуру и диссоциирует от Nrf2, что дает возможность последнему проследовать в ядро и связаться со специальным белком Maf, с дальнейшим связыванием этого комплекса с ARE (антиоксидант-респонсным элементом) в промотерной области генов, отвечающих за синтез защитных (антиоксидантных) молекул. Это включает активацию синтеза ферментов первой линии антиоксидантной защиты (СОД, глутатионпероксидазы и каталазы), ферментов, участвующих в детоксикации чужеродных веществ (гемоксигеназы (HO-1), глутатион-трансферазы), ферментов синтеза глутатиона и НАДФН, а также нескольких сотен других защитных молекул.

Таким образом, Nrf2 называют «дирижером» антиоксидантной системы организма, который во многом отвечает за скоординированную работу всех звеньев данной системы и обеспечивает адаптацию к стрессу. Считается, что Nrf2 активируется в условиях слабого стресса.

Когда сила стресса превышает определенный пороговый уровень активируются другие факторы транскрипции, в том числе NF-κB, являю-

щийся регулятором многих клеточных процессов, включая иммунитет и воспаление. Этот фактор состоит из 5 белков, способных связываться с ДНК. Данный фактор активируется многими стимулами, включая окислительный стресс. Установлено, что NF-κB регулирует различные гены, включая провоспалительные цитокины и адгезивные молекулы лейкоцитов, белки острой фазы и антимикробные пептиды. Существует определенное сходство в действии NF-κB с вышеописанным Nrf2. Данный фактор тоже существует в цитоплазме в неактивной форме, связанный с белком-репрессором IκB. В результате стресса или воздействия цитокинов, белок-репрессор фосфорилируется и подвергается деградации в протеасомах. Освободившийся и активированный NF-κB переносится в ядро и вызывает активирование/транскрипцию генов, ответственных за выживание клеток и вовлеченных в воспаление, иммунитет, апоптоз, клеточную пролиферацию и дифференциацию.

В целом существует очень тесная взаимосвязь между основными факторами транскрипции, в том числе вышеупомянутыми Nrf2 и NF-κB, витагенами и другими элементами антиоксидантной системы, включая митохондрии — основной источник свободных радикалов в клетке. При этом очень часто активаторы Nrf2 ингибируют NF-κB, в то время как NF-κB может подавлять транскрипционную активность Nrf2 (Surai et al., 2019). В целом следует подчеркнуть, что активация витагенов осуществляется через такие факторы транскрипции, как Nrf2 (СОД, гемоксигеназа и др.), NF-κB (СОД и др.), HSF (HSP70) и через другие механизмы (сиртуины).

Особенности микробиоты кишечника птиц

Кишечник птиц содержит плотную, разнообразную и динамическую экосистему, играющую важную роль в поддержании здоровья кишечника и здоровья всего организма. Микробиота являет собой разнообразную популяцию микроорганизмов в конкретных условиях среды, в то время как микробиом определяется как генетическая или экологическая емкость микробиоты (Reid, Greene, 2014). Исследования микробиоты в медицинской практике несколько опережают то, что сделано в птицеводстве. Например, микробиота кишечника человека включает от 500 до 1000 видов бактерий с общим количеством бактерий, достигающим 10^{14} (100 триллионов), которые содержат в 100 раз больше генов, чем человеческий геном (DuPont, DuPont, 2011). При этом микроорганизмов в кишечнике присутствует по количеству в 10 раз больше, чем всех клеток в человеческом организме (Conlon, Bird, 2014).

В дополнение к бактериям микробиота кишечника также включает вирусы и грибки. Интересно, что в кишечнике человека более 90%

всех бактерий относятся к двум основным филам — *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Сложности в работе с микробиотой кишечника заключаются в том, что менее 20% всех идентифицированных видов бактерий поддаются культивированию и состав микробиоты зависит от многих факторов, включая возраст, средовые и генетические факторы, состав рациона/корма, использование лекарственных препаратов, включая антибиототики. Принимая во внимание важность состава микробиоты кишечника и ее зависимость от состава рациона питания, можно перефразировать известную фразу «мы едим то, что мы едим» в «мы едим то, что едят микробы нашего кишечника».

В целом, микробиоту в основных отделах кишечника птиц можно охарактеризовать следующим образом (Oakley et al., 2014):

- Зоб: доминантами микрофлоры являются различные *Lactobacillus* spp. Микробная концентрация составляет до 10^9 клеток/г.

- Железистый и мышечный желудок: доминируют *Lactobacilli*. Низкие значения pH уменьшают концентрацию микробных клеток до уровня менее 10^8 клеток/г.

- Тонкий кишечник (12-перстная, тощая и подвздошная кишки): доминантами являются *Lactobacillus*, *Enterococcus* и различные *Clostridiaceae*. Концентрация бактерий — 10^9 – 10^{10} клеток/г.

- Слепые отростки: доминантами являются *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, присутствуют также *Actinobacteria*. Концентрация бактерий достигает 10^{11} клеток/г.

При изучении микробиоты кишечника наиболее часто исследуют слепые отростки, поскольку в них корм задерживается больше всего. Например, время прохождения корма от рта цыпленка до нижней части подвздошной кишки занимает примерно 3 часа, в то время как в слепых отростках корм задерживается вплоть до 35 часов (Scanes et al., 2004). По другим данным, прохождение корма по верхней части кишечного тракта (тонкому кишечнику) занимает около 2,5 часов, в то время как его ферментация в слепых отростках кишечника занимает 12–20 часов (Sergeant et al., 2014).

Слепые отростки характеризуются наибольшей микробной популяцией и вариативностью видов микроорганизмов, оказывающих значительное воздействие на организм хозяина (Pan, Yu, 2014). У птиц микробиота слепых отростков кишечника способна переваривать корм, с высоким содержанием целлюлозы, крахмала и резистентных полисахаридов (Clench, Mathias, 1995). Считается, что до 10% необходимой энергии для птицы извлекается в процессе ферментации в слепых отростках кишечника (Jozefiak et al., 2004; Hegde et al., 1982), и корма с высоким

уровнем клетчатки способствуют увеличению размера данных отростков (Jørgensen et al., 1996). У отдельных цыплят, количество филотипов, найденных в слепых отростках кишечника варьировало от 200 до 350 (Sergeant et al., 2014).

Таксономический анализ полученных результатов при изучении микробиоты слепых отростков свидетельствует о том, что 98% обнаруженных в кишечнике последовательностей РНК относятся к микроорганизмам, в то время как лишь 1% относятся к самой птице и меньше 0,1% принадлежат грибкам и вирусам (Sergeant et al., 2014). При этом следует иметь в виду широкую вариабельность в составе микрофлоры как между подгруппами одной и той же группы, так и индивидуальные различия внутри той же самой подгруппы.

Птицеводство отличается от других видов животных тем, что цыпленок вылупляется без контакта с материнским организмом. Таким образом, бактерии из внешней среды, включая персонал, который работает с птицей в инкубатории, подстилка в корпусах, корм и ящики для транспортировки цыплят играют большую роль, чем материнская микробиота, в заселении кишечника микрофлорой. Принято считать, что колонизация кишечника начинается сразу после вылупления цыпленка, поэтому условия в выводном шкафу в инкубатории во многом являются определяющими для развития микрофлоры. Тем не менее следует иметь в виду, что бактерии способны проникать в яйцо в процессе его снесения, сбора, хранения и инкубации. Особую роль играют средства санации яиц, особенно тех, которые собраны с пола корпуса.

Несмотря на несомненные успехи в изучении микробиоты слепых отростков птицы в последние годы, исследования показали, что большинство последовательностей 16S rRNA в содержимом слепых отростков птиц принадлежит к пока еще не идентифицированным видам бактерий (Roto et al., 2015). Отметим, что исследования в этой области находятся лишь на начальной стадии, но их результаты обещают сделать прорыв в современном птицеводстве.

Таким образом, активация витагенов в кишечнике зависит как от энтероцитов, так и от микробиоты. Взаимодействие микробиоты с организмом хозяина происходит на различных уровнях. Во-первых, это осуществляется через специфические микробные компоненты (липополисахариды, липотейхоевые кислоты, флагеллин), метаболиты (бутираты и пропионаты), токсины (токсин А из *Clostridium difficile*, энтеротоксин В, являющийся суперантигеном, из *Staphylococcus aureus*) и другие растворимые вещества (например, пептиды). Все эти вещества распознаются специфическими рецепторами (толл-подобными рецеп-

торами — TLR) или же переносятся в кишечные эпителиальные клетки специфическими транспортерами (например, пептид-транспортер PепТ1). При этом задействованы внутриклеточные сигнальные системы, включая различные киназы (например, р38 MAPK).

Следует иметь в виду, что вещества-индукторы витагенов (HSP70) действуют в очень низких концентрациях (на уровне наногرامмов) и вызывают адаптивный ответ очень быстро (в течение нескольких часов). Анаэробные бактерии (например, *Bacteroides fragilis*) играют важную роль в индукции HSP70. К тому же, различные грамотрицательные бактерии (например, *E. coli*) и грам-положительные бактерии (*Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*) также вызывают индукцию HSP70 в кишечном эпителии *in vitro* и *in vivo*. Интересно отметить, что ряд антибиотиков, например, метронидазол, способны снижать уровень HSP70 и повышать чувствительность к микробным токсинам (Lallès, 2016).

В целом нормальная микрофлора кишечника положительно сказывается на поддержании редокс-баланса кишечника, в то время как патогены приводят к нарушению данного баланса, вызывая окислительный стресс с последующим нарушением целостности кишечника, проявляющемся в энтеритах.

Микробиота, антиоксиданты и иммунитет

Важнейшим связующим звеном между антиоксидантами и микробиотой в кишечнике является иммунная система, в частности, иммунная система кишечника птиц, детали функционирования которой и молекулярные механизмы ее регуляции были описаны в нашем обзоре (Фисинин, Сурай, 2013). С одной стороны, редокс-баланс в кишечнике является определяющим фактором созревания и сигнализации/коммуникации между различными типами иммунных клеток. С другой стороны, микробиота кишечника является своеобразным «тренером», обучающим иммунитет кишечника эффективно функционировать и различать «свой-чужой».

Особую роль играют функции микробиоты снижать образование провоспалительных цитокинов через ингибирование вышеупомянутого фактора транскрипции NF-κB. Одновременно с этим идет стимулирование активности другого фактора транскрипции Nrf2, ответственного за антиоксидантную систему и восстановление эффективной сигнализации в клетках, включая иммунные клетки. Это создает возможность для более эффективного действия иммунных механизмов защиты организма птиц в условиях различных стрессов, включая микробные и вирусные

инфекции. В этом задействованы как лимфоциты, так и фагоцитарные клетки. Следует иметь ввиду, что вышеупомянутые витагены играют решающую роль в данном адаптивном процессе.

Пути модуляции антиоксидантного статуса и микробиоты у сельскохозяйственных птиц

Понимая важность баланса между антиоксидантами и микробиотой в поддержании здоровья кишечника и иммунитета сегодня существует множество подходов к модуляции данного баланса, включая:

- Пробиотики — препараты, содержащие микроорганизмы, способствующие установлению оптимального микробиального баланса в кишечнике, что обеспечивает как повышенную резистентность птицы к различным заболеваниям, так и улучшает показатели роста и развития птицы.

- Витаген-стимулирующие добавки — препараты, способствующие активации витагенов в организме птицы, включая кишечник, и тем самым обеспечивающие эффективность саморегулирующейся системы, включая баланс антиоксиданты — микробиота. Это дает возможность поддерживать оптимальные условия в кишечнике как с точки зрения всасывания питательных веществ, так и для оптимального баланса/состава микробиоты.

- Пребиотики — препараты, поставляющие в организм птицы вещества, которые плохо перевариваются в тонком кишечнике и являются важнейшим субстратом для развития микробиоты в слепых отростках кишечника.

- Синбиотики — комбинация пробиотиков и пребиотиков, положительно сказывающаяся на развитии полезной микробиоты и поддерживающая здоровье птицы.

- Другие препараты — сюда можно отнести различные кормовые добавки, включая бутираты, эфирные масла, различные смеси экстрактов растений и др.

При рассмотрении влияния различных препаратов на микробиоту кишечника следует иметь ввиду, что бактерии кишечника могут проявлять и отрицательное действие по отношению к хозяину (птице), например:

- Они конкурируют за нутриенты с хозяином; следовательно, повышенный расход нутриентов может отрицательно сказаться на общем балансе организма.

- Могут вызвать постоянный воспалительный ответ. Энтериты, особенно в субклинической форме, являются важнейшей проблемой современного птицеводства, особенно после запрещения кормовых антибиотиков.

- Стимулируют быстрое обновление эпителиальных клеток, что требует затрат протеина и энергии и может снизить продуктивность.

Таким образом, важнейшей задачей птицеводческой науки сегодня является расшифровка молекулярных механизмов регуляции редокс-баланса кишечника и микробиоты с целью поддержания этих параметров в оптимальном состоянии для получения максимальной продуктивности и здоровья птицы.

Дальнейшее развитие концепции витагенов, одновременно с более глубоким изучением микробиоты кишечника птицы, связано с использованием в кормах или выпойкой с водой ряда веществ, которые не являются незаменимыми факторами питания и ранее на них мало обращали внимания. Среди них следует упомянуть карнитин, который сегодня рассматривается в качестве антиоксиданта нового поколения (Surai, 2015a,b,c), участвующего в регуляции многих важнейших процессов и обладающий гепатопротекторными свойствами. При этом комбинация карнитина с другими антиоксидантами (например, бетаином и силимагином) является важнейшим шагом вперед по разработке эффективных приемов поддержания здоровья печени у кур-несушек и кур родительского стада на пике продуктивности. Интересно отметить, что в литературе появляется все больше доказательств существования тесной связи между микробиотой и состоянием печени.

В последнее время пересматривается роль таурина, небелковой аминокислоты, которая находится в организме птиц в очень высоких концентрациях и играет важнейшую роль в регуляции как антиоксидантной системы, так и микробиоты (Сурай, 2018a). При этом появляются данные о том, что таурин участвует в поддержании здоровья (структуры и функций) скорлупной железы, которая определяет не только качество скорлупы, но и является важнейшим фактором, регулирующим яйценоскость птиц. К тому же новая наиболее активная форма витамина D₃ (1,25D₃) в комбинации с таурином и минералами может помочь решить вопросы качества скорлупы у птицы при ее длительной эксплуатации (Сурай, 2018b,c). Вероятно, существует взаимосвязь здоровья скорлупной железы и микробиоты кишечника.

Интересно отметить, что основными источниками карнитина и таурина в рационе птиц являются корма животного происхождения. В результате исключения или значительного снижения количества кормов животного происхождения в рационах птиц может возникнуть дефицит как карнитина, так и таурина. При этом в стресс-условиях, нарушающих синтез этих веществ и увеличивающих потребность в них, карнитин и таурин становятся незаменимыми факторами питания. Таким образом,

роль карнитина и таурина в поддержании структуры кишечника и микробиоты заслуживает дополнительного внимания.

Заключение

В условиях современного птицеводства роль здоровья кишечника трудно переоценить, и в этом отношении поддержание оптимального редокс-баланса и микробиоты являются важнейшими элементами современной технологии (Сурай, 2019а). При этом уже доказано, что редокс-баланс определяет эффективность иммунитета и отвечает за целостность как ворсинок кишечника, так и защитной роли слизистой кишечника. С другой стороны, оптимальный баланс микробиоты отвечает за:

- защиту от патогенов путем выделения различных веществ, препятствующих колонизации патогенов, замещения мест связывания патогенов в кишечнике или выделения веществ (например, бутиратов), способствующих росту ворсинок, и
- улучшение переваривания ряда труднопереваримых веществ в слепых отростках кишечника, выделяя дополнительную энергию из корма и синтезируя витамины группы В и витамин К. При этом обратная перистальтика кишечника позволяет этим веществам достигнуть тонкого кишечника, где они могут эффективно всасываться.

В целом понимание молекулярных механизмов взаимодействия редокс-баланса, витагенов и микробиоты в кишечнике позволит решить ряд фундаментальных проблем, связанных со здоровьем кишечника/энтеритами в условиях исключения кормовых антибиотиков (Сурай, 2019b).

В этом отношении разработка и широкое использование в птицеводстве разных стран, включая Россию, витамин-регулирующих добавок (Меджик Антистресс Микс/PerforMax, VitaTonic, ShellBone и др.) являются первым шагом внедрения в производство результатов исследований защитной роли витагенов и их взаимодействия с микробиотой кишечника. Например, выяснение роли воспаления в скорлупной железе в образовании внутренней насечки скорлупы позволило предложить эффективные методы профилактики путем использования оптимальной смеси таурина, гормональной формы витамина Д и ряда других нутриентов (ShellBone; Сурай, 2019с). При этом снижение активности провоспалительного фактора транскрипции (NF-κB) и активация другого важного фактора транскрипции (Nrf2) являются важнейшими механизмами регуляции активности витагенов как в кишечнике, так и в скорлупной железе.

Данные исследования проводятся при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

Григорьева М.А., Величко О.А., Шабалдин С.В., Фисинин В.И., Сурай П.Ф. Регуляция активности витагенов как новая антистрессовая стратегия в птицеводстве: обоснование и производственный опыт // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 4. С. 716–730.

Сурай П.Ф. Таурин и карнитин в птицеводстве: от активации витагенов к поддержанию здоровья птицы // Птицеводство.ua. 2018a. № 1–2. С. 12–17.

Сурай П.Ф. Качество костяка и скорлупы у птиц во второй половине продуктивного периода: Роль витамина Д (Часть 1) // Птицеводство.ua. 2018b. № 9. С. 6–11.

Сурай П.Ф. Качество костяка и скорлупы у птиц во второй половине продуктивного периода: Роль витамина Д (Часть 2) // Птицеводство.ua. 2018c. № 10. С. 16–17.

Сурай П.Ф. Кишечник сельскохозяйственных птиц в XXI столетии: Проблемы и решения // Птицеводство.ua. 2019a. № 3. С. 18–22.

Сурай П.Ф. Роль микробиоты в поддержании редокс-баланса кишечника птиц // Птицеводство.ua. 2019b. № 4. С. 10–14.

Сурай П.Ф. Снижение внутренней насечки яичной скорлупы: от витагенов к концепции ShellBone // Птицеводство.ua. 2019c. № 5. С. 24–27.

Сурай П.Ф., Кочиш И.И., Фисинин В.И., Грозина А.А., Шацких Е.В. Молекулярные механизмы поддержания здоровья кишечника птицы: Роль микробиоты. М.: Сельскохозяйственные технологии, 2018. 344 с.

Фисинин В.В., Сурай П.Ф. Иммуитет кишечника у птиц: факты и размышления // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 4. С. 3–25.

Шацких Е.В., Латыпова Е.Н., Несвет Е.Г., Кобурнеев И.В. Использование антистрессовых препаратов в яичном птицеводстве. Екатеринбург: Уральский государственный аграрный университет, 2016. 201 с.

Clench M.H., Mathias J.R. The avian cecum: a review // The Wilson Bulletin. 1995. Vol. 107. No. 1. P. 93–121.

Conlon M.A., Bird A.R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health // Nutrients. 2014. Vol. 7. No. 1. P. 17–44.

DuPont A.W., DuPont H.L. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2011. Vol. 8. No. 9. P. 523–531.

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*. Vol. 82. No. 10. P. 1500–1508.

Hegde S.N., Rolls B.A., Coates M.E. The effects of the gut microflora and dietary fibre on energy utilization by the chick // *British Journal of Nutrition*. 1982. Vol. 48. No. 1. P. 73–80.

Jørgensen H., Zhao X.Q., Knudsen K.E., Eggum B.O. The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens // *British Journal of Nutrition*. 1996. Vol. 75. No. 3. P. 379–395.

Jozefiak D., Rutkowski A., Martin S.A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review // *Animal Feed Science and Technology*. 2004. Vol. 113. No. 1–4. P. 1–15.

Lallès J.P. Microbiota-host interplay at the gut epithelial level, health and nutrition // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2016. Vol. 7. No. 1. P. 66.

McLean J.A., Karadas F., Surai P.F., McDevitt R.M., Speake B.K. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract // *Comparative Biochemistry and Physiology — Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 2005. Vol. 141. No. 3. P. 366–372.

Oakley B.B., Lillehoj H.S., Kogut M.H., Kim W.K., Maurer J.J., Pedroso A., Lee M.D., Collett S.R., Johnson T.J., Cox N.A. The chicken gastrointestinal microbiome // *FEMS Microbiology Letters*. 2014. Vol. 360. No. 2. P. 100–112.

Pan D., Yu Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet // *Gut Microbes*. 2014. Vol. 5. No. 1. P. 108–119.

Reid A., Greene S. *Faq: human microbiome*. Washington, DC: American Academy of Microbiology, 2014.

Roto S.M., Rubinelli P.M., Ricke S.C. An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives // *Frontiers in Veterinary Science*. 2015. Vol. 2. P. 28.

Sergeant M.J., Constantinidou C., Cogan T.A., Bedford M.R., Penn C.W., Pallen M.J. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. No. 3. P. e91941.

Shatskikh E., Latipova E., Fisinin V., Denev S., Surai P.F. Molecular mechanisms and new strategies to fight stresses in egg-producing birds // *Agricultural Science and Technology*. 2015. No. 7. No. 1. P. 3–10.

Scanes C.G., Brant G., Ensminger M.E. *Poultry biology* // *Poultry science*. 4th ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall, 2004. P. 22–45.

Surai K.P., Surai P.F., Speake B.K., Sparks N.H.C. Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: Food for thought. 1. Prooxidants // *Nutritional Genomics & Functional Food*. 2003. Vol. 1. No. 1. P. 51–70.

Surai K.P., Surai P.F., Speake B.K., Sparks N.H.C. Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: Food for thought. 2. Antioxidants // *Current Topics in Nutraceutical Research*. 2004. Vol. 2. No. 1. P. 27–46.

Surai P.F. Antioxidant action of carnitine: molecular mechanisms and practical applications // *EC Veterinary Science*. 2015a. Vol. 2. No. 1. P. 66–84.

Surai P.F. Carnitine enigma: from antioxidant action to vitagene regulation. Part 1. Absorption, metabolism and antioxidant activities // *Journal of Veterinary Science & Medicine*. 2015b. Vol. 3. No. 2. P. 14.

Surai P.F. Carnitine enigma: from antioxidant action to vitagene regulation. Part 2. Transcription factors and practical applications // *Journal of Veterinary Science & Medicine*. 2015c. Vol. 3. No. 2. P. 17.

Surai P.F. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase // *Journal of Animal Research and Nutrition*. 2016. Vol. 1. No. 1. P. 8.

Surai P.F. Selenium in poultry nutrition and health. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University Publishers, 2018.

Surai P.F., Fisinin V.I. Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: applications in chick placement and pig weaning // *Journal of Veterinary Science & Medicine*. 2015. Vol. 3. No. 1. P. 1–16.

Surai P.F., Fisinin V.I. Vitagenes in poultry production. Part 1. Technological and environmental stresses // *World's Poultry Science Journal*. 2016a. Vol. 72. No. 4. P. 721–733.

Surai P.F., Fisinin V.I. Vitagenes in poultry production. Part 2. Nutritional and internal stresses // *World's Poultry Science Journal*. 2016b. Vol. 72. No. 4. P. 761–772.

Surai P.F., Fisinin V.I. Vitagenes in poultry production. Part 3. Vitagene concept development // *World's Poultry Science Journal*. 2016c. Vol. 72. No. 4. P. 793–804.

Surai P.F., Kochish I.I. Antioxidant systems and vitagenes in poultry biology: heat shock proteins // *Heat shock proteins in veterinary medicine and sciences*. Heat shock proteins / A. Asea, P. Kaur (eds.). Cham, Switzerland: Springer, 2017. P. 123–177.

Surai P.F., Kochish I.I., Fisinin V.I. Antioxidant systems in poultry biology: Nutritional modulation of vitagenes // *European Journal of Poultry Science*. 2017. Vol. 81. doi: 10.1399/eps.2017.214.

Surai P.F., Kochish I.I., Fisinin V.I., Kidd M.T. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: an update // *Antioxidants (Basel)*. 2019. Vol. 8. No. 7. pii: E235.

Varasteh S., Braber S., Akbari P., Garssen J., Fink-Gremmels J. Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galacto-oligosaccharides // PLoS One. 2015. Vol. 10. No. 9. P. e0138975.

Optimal redox balance maintenance in poultry gut: problems and solutions

Surai P.F.,^{1, 2, 3, 4} Kochish I.I.,⁴ Fisinin V.I.,⁵ Nikonov I.N.,^{4,5} Romanov M.N.^{4,6}

¹ Szent Istvan University, Gödöllo, Hungary

² Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria;

³ Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

⁴ K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

⁵ All-Russian Poultry Research and Technological Institute, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia;

⁶ University of Kent, Canterbury, UK.

Abstract

In commercial poultry production, important roles of gut health are difficult to over-estimate and, therefore, maintenance of the optimal redox-balance in the gut become a research priority in poultry sciences. On the one hand, it is proven that optimal redox balance in the intestine is a key for high immunocompetence, including gut immunity. On the other hand, optimal redox balance in microbiota is responsible for protection against pathogens and improvement of nutrient digestibility. In general, understanding of molecular mechanisms of interactions between redox balance, vitagenes and microbiota in the gut will allow to answer some fundamental questions associated with gut health/enteritis problems as a result of dietary antibiotic prohibition in poultry production.

Key words: gut, oxidative stress, microbiota, poultry, vitagenes

УДК 579.64

Полногеномное секвенирование штаммов для производства пробиотических препаратов

Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А.

ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: georg-laptev@rambler.ru

Аннотация

В настоящем исследовании представлены результаты полногеномного секвенирования штаммов пробиотических микроорганизмов, выполненного с целью изучения биологических свойств и разработки биологических препаратов для нормализации микробиома ЖКТ, способствующих улучшению здоровья и повышению продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы. В рамках исследования нами была выполнена реконструкция метаболических путей штаммов бактерий, входящих в состав кормовой добавки Профорт, предназначенной для сельскохозяйственных животных и птиц. Всего в геноме каждого из исследуемых штаммов выявлено свыше 6 тысяч аннотированных генов. В результате проведения биоинформатической обработки нуклеотидных последовательностей геномов бактерий с использованием базы данных «KEGG» установлено, что исследуемые штаммы в составе пробиотика Профорт обладают рядом метаболических путей, которые предсказывают наличие комплекса полезных свойств, придающих им гораздо более выраженную метаболическую активность по сравнению с другими штаммами аналогичных видов бактерий. Для исследуемых штаммов показана особенность путей их углеводного обмена, путей биосинтеза ряда жирных кислот, ряда заменимых и незаменимых аминокислот, витаминов, антимикробных метаболитов. Помимо этого, установлена способность штаммов к деструкции токсичных соединений. В результате выполнения исследования показано, что применение метода полногеномного секвенирования позволяет оценивать эффективность, совершенствовать и получать биологические препараты с заданными функциональными свойствами для животноводства и птицеводства.

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, гены, метаболические пути, полногеномное секвенирование

Введение

Анализ современного состояния сельскохозяйственной отрасли показал, что интенсивное развитие, создание крупномасштабных предприятий, позволяющих на ограниченной территории содержать значительное поголовье животных и птицы, часто приводит к возникновению ряда проблем, включая технологические сбои, нарушение ветеринарно-санитарных правил содержания, несбалансированное кормление, микотоксикозы и другие факторы стресса, что оказывает значительное отрицательное влияние на резистентность организма, вызывает иммунодепрессивные состояния и, как следствие, приводит к возникновению болезней различной этиологии, снижению продуктивности и продуктивного долголетия сельскохозяйственных животных и птицы (Джавалов и др., 2016; Collier et al., 2010).

Все это вызывает острую необходимость применения в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц пробиотиков на основе живых культур полезных бактерий, способных к нормализации ЖКТ (Малик, Панин, 2001; Czerwinski et al., 2010). В связи с этим не вызывает сомнений важность изучения свойств пробиотических микроорганизмов. Широкие возможности в этом направлении открывают современные молекулярно-генетические подходы, основанные на анализе генома микроорганизмов. Метод полногеномного секвенирования позволяет в полной мере оценить генетический потенциал организма, научно обосновать исчерпывающий генетический паспорт для коммерческого использования (Бережная и др., 2019).

Результатом анализа генома является реконструкция метаболических путей изучаемого штамма, которая позволяет оценить его возможные, неизвестные или ранее не выявленные метаболические возможности. Имея полногеномную нуклеотидную последовательность, можно с помощью сравнения с уже аннотированными геномами хорошо изученных штаммов отобрать ряд генетических детерминант, предположительно участвующих в исследуемом процессе и изучить их роль. Применение данного метода имеет широкие перспективы к оценке эффективности и совершенствованию биопрепаратов для животноводства и птицеводства.

Таким образом, реконструкция метаболических путей на основе анализа генома является важным этапом всестороннего анализа свойств микроорганизмов в составе пробиотических препаратов для оценки спектра возможностей и конкурентоспособности штаммов при их интродукции в кишечник хозяина. В связи с этим процесс создания метаболических карт может приводить к изучению метаболического потенциала пробиотических штаммов уже на этапе разработки биопрепарата.

Цель настоящего исследования состояла в изучении биологических свойств штаммов пробиотических бактерий и оценке потенциала их применения в составе кормовых добавок для сельскохозяйственных животных и птиц с целью улучшения их здоровья и повышения продуктивности.

Материалы и методы

В рамках проекта нами была выполнена реконструкция метаболических путей штаммов бактерий на основе результатов полногеномного секвенирования их генома. Были исследованы штаммы бактерий *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium*, входящие в состав кормовой добавки Профорт, предназначенной для сельскохозяйственных животных и птиц.

Тотальную ДНК микроорганизмов осуществляли с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» (Fermentas, Inc., Литва), следуя рекомендациям производителя.

Секвенирование генома бактерий выполнено методом высокопроизводительного NGS-секвенирования на приборе MiSeq с применением набора реагентов для проведения секвенирования MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycles), а также наборов реагентов для приготовления библиотек Nextera DNA Flex Library Kit XT Index Kit (24 samples) и Nextera DNA CD Indexes (24 indexes, 24 samples). Биоинформатическая обработка результатов ДНК-секвенирования включала контроль качества ридов с применением программы «Trimmomatic», удаление прочтений низкого качества и прочтений адаптерных последовательностей, сборка генома с применением программы «Spades», контроль качества сборки при помощи программы «Quast», аннотацию с использованием «Prokka», картирование полученных прочтений на референсный геном. Функциональная аннотация была проведена в базе данных «KEGG Automatic Annotation Server».

Результаты и обсуждение

Проведенный филогенетический анализ штаммов *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* в составе пробиотика Профорт выявил уникальность метаболических возможностей данных микроорганизмов по сравнению с аналогичными видами бактерий.

Так, на рис. 1 показана степень филогенетической близости штамма *Bacillus megaterium* в составе Профорта к геномам родственных микроорганизмов. Видно, что между штаммом бактерии в составе биопрепарата и другими микроорганизмами того же вида были обнаружены

значительные различия в составе геномов, а, следовательно, и уникальность путей метаболизма.

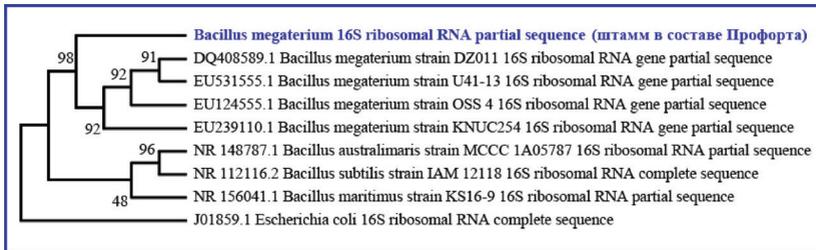


Рис. 1. Филогенетический анализ штамма *Bacillus megaterium*

В геноме *Bacillus megaterium* выявлено 6324 аннотированных генов, *Enterococcus faecium* — 6585. В результате проведения биоинформатической обработки нуклеотидных последовательностей геномов бактерий с использованием базы данных «KEGG» установлено, что исследуемые штаммы *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* в составе пробиотика Профорт обладают рядом метаболических путей, которые предсказывают наличие комплекса полезных свойств, придающих им гораздо более выраженную метаболическую активность по сравнению с другими штаммами аналогичных видов бактерий (рис. 2).

Как видно из рис. 2, в нуклеотидной последовательности штаммов *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* предсказаны метаболические пути образования ряда ферментов, участвующих в биосинтезе важнейших соединений: аминокислот, в том числе незаменимых, витаминов, органических кислот, бактериоцинов и др.

Так, например, **цистеин** и **метионин**, метаболические пути которых выявлены у штамма *Enterococcus faecium*, являются лимитирующими для птиц, поскольку в составе рационов наиболее часто наблюдается дефицит их содержания. Преимуществами микробного синтеза аминокислот перед химическим является способность бактерий образовывать эти вещества в биологически активной L-форме.

Особое значение имеет непотеиногенная **γ -аминомасляная кислота (ГАМК)**, которая принимает участие в нейромедиаторных и метаболических процессах, метаболические пути синтеза которой были выявлены у *Bacillus megaterium*. ГАМК используется в промышленном птицеводстве в качестве адаптогена, в том числе для профилактики каннибализма, повышения резистентности организма, нормализации нейрогуморального статуса.

<i>BACILLUS MEGATERIUM</i>		<i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>
1. СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ глицин триптофан серин валин треонин лейцин гистидин изолейцин фенилаланин	5. СИНТЕЗ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ янтарная фумаровая масляная	1. СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ: лизин метионин цистеин аргинин
2. СИНТЕЗ γ-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ	6. СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ рибофлавин ретинол фолиевая янтарная кислота пантотеновая кислота	2. ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ с антимикробными свойствами
3. СИНТЕЗ БАКТЕРИОЦИНОВ из группы ансамицинов	7. КОЛОНИЗАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ: био пленки защитные жгутики полисахариды	3. СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ биотин тиамин
4. СИНТЕЗ АНТИОКСИДАНТОВ глутатион		4. БИОДЕСТРУКЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Рис. 2. Генетические системы и метаболические пути, предсказанные у штаммов бактерий *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* в составе пробиотика Профорт

Одним из важнейших продуктов бактериального синтеза являются такие соединения, как **органические кислоты**, значение которых для организма животных и птиц чрезвычайно важно. У штаммов бактерий *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* в составе пробиотика Профорт аннотированы гены метаболических путей ряда органических кислот (уксусная, масляная, фумаровая и др.), которые обладают противовоспалительным воздействием, защищают организм от патогенов и токсинов, поддерживают микробное равновесие и целостность слизистой кишечника. Кроме того, у штаммов обнаружены пути биосинтеза жирных кислот — додекановой, декановой, гексадекановой, тетрадекановой, октадекановой.

Так, например, **бутират**, пути метаболизма которого выявлены у *Bacillus megaterium*, стимулирует обновление клеток слизистой кишечника — рост и пролиферацию энтероцитов, крипт, влияет на кровоток в слизистой и является основным энергетическим субстратом для клеток кишечника, обеспечивая до 70% потребности в энергии, а также участвует в регуляции многих метаболических и сигнальных процессов в ЖКТ.

Не менее ценным свойством исследуемых бактерий является способность образовывать **витамины**. В составе генома штамма *Bacillus megaterium* обнаружено много генов, связанных с синтезом витаминов В₁, В₂, В₉ и биотина. Так, например, многие животные и птицы — аутотрофы по биотину. Он играет важную роль во многих обменных про-

цессах в организме. При недостатке биотина у цыплят и индюшат возникает депрессия роста, дерматиты на конечностях, в области головы, век, углов клюва, встречаются случаи перозиса.

Кроме того, в составе генома штамма *Bacillus megaterium* обнаружено много генов, связанных с синтезом ансамициновых **бактериоцинов**, которые эффективны против многих грамположительных и грамотрицательных патогенов. Помимо этого, в составе его генома присутствуют гены синтеза **глутатиона** — одного из важнейших компонентов антиоксидантной защиты у птиц, препятствующей повреждению биологических молекул и гибели клеток в результате действия свободных радикалов.

Установлено, что штаммы бактерий *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* обладают крайне высоким потенциалом в **биодegradации токсичных соединений**, что объясняет его активную способность разрушать микотоксины кормов.

Интересно, что у штамма *Bacillus megaterium* был выявлен целый набор специфических генов, которые указывают на его способность к адаптации, выживанию и эффективному увеличению численности в кишечнике птиц. Так, в геноме штамма выявлены метаболические пути формирования **биопленок**, позволяющих штамму выстилать и колонизировать поверхность слизистой кишечника. Эта способность определяется выраженными свойствами к адгезии благодаря наличию различных поверхностных структур: жгутиков, пилей и белков наружной мембраны. После завершения адгезии бактерии начинают активно выделять экзополисахариды, заполняющие межклеточное пространство, что обеспечивает устойчивость к действию повреждающих физико-химических факторов.

Заключение

Как видно из представленных результатов, полногеномное секвенирование геномов пробиотических штаммов с последующим функциональным анализом реконструкции их метаболических путей позволило провести оценку механизмов действия и метаболического потенциала микроорганизмов. Проведенный анализ генома штаммов, входящих в состав пробиотика Профорт, выявил уникальность метаболических возможностей данных микроорганизмов по сравнению с аналогичными видами бактерий. Показана особенность путей их углеводного обмена, в том числе наличия путей биосинтеза ряда жирных кислот, ряда заменимых и незаменимых аминокислот, витаминов, антимикробных метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

Бережная А.В., Евдокимова О.В., Валентинович Л.Н., Сверчкова Н.В., Титок М.А., Коломиец Э.И. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генома бактерий *Bacillus velezensis* БИМ И-439Д // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 366–377.

Джавадов Э.Д., Дмитриева М.Е., Трефилов Б.Б., Новикова О.Б., Титова Т.Г. Инфекционная патология в промышленном птицеводстве: реалии и перспективы // Ветеринария и кормление. 2016. № 2. С. 24–27.

Малик Н.И., Панин А.Н. Ветеринарные пробиотические препараты // Ветеринария. 2001. № 1. С. 27.

Collier C.T., Hofacre C.L., Payne A.M., Anderson D.B., Kaiser P., Mackie R.I., Gaskins H.R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth // Veterinary Immunology and Immunopathology. 2008. Vol. 122. P. 104–115.

Czerwinski J., Hojberg O., Smulikowska S., Engberg R.M., Mieczkowska A. Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens // British Poultry Science. 2010. Vol. 51. No. 2. P. 258–569.

Whole genome sequencing of strains for the probiotic preparations production

Laptev G.Yu., Ilina L.A.

BIOTROF Ltd, St Petersburg, Russia

Abstract

This study presents the results of whole genome sequencing of probiotic microorganisms strains performed to study biological properties and develop biological products to normalize the digestive tract microbiome, which may contribute to improving health and increasing productivity of farm animals and poultry. As part of the study, we reconstructed the metabolic pathways of bacterial strains that are part of the Profort feed additive intended for feeding farm animals and poultry. In total, more than 6000 annotated genes were identified in the genome of each of the studied strains. As a result of bioinformatics processing of the bacterial genomes' nucleotide sequences by using the KEGG database, it was found that the studied strains of the Profort probiotic have a number of metabolic pathways that predict the presence of several

useful properties that give them much more pronounced metabolic activity compared to other strains of the same types of bacteria. For the studied strains, specific pathways of the carbohydrate metabolism, and biosynthesis of a number of fatty acids and a number of interchangeable and irreplaceable amino acids, vitamins, and antimicrobial metabolites were shown. In addition, the ability of strains to destruct toxic compounds was observed. As a result of the research, it was shown that the use of whole genome sequencing method allows us to evaluate the effectiveness, improve and obtain biological preparations with desired functional properties for livestock and poultry farming.

Key words: probiotic microorganisms, genes, metabolic pathways, genome-wide sequencing

УДК 636.5.087.8

Анализ сопряженных изменений экспрессии генов и биохимических показателей крови в эксперименте на курах-несушках

Нарушин В.Г.,¹ Селина М.В.,² Романов М.Н.^{2,3}

¹ ООО «Вита-Маркет», Запорожье, Украина;

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

³ Университет Кента, Кентербери, Великобритания.

E-mail: val@vitamarket.com.ua

Аннотация

Практика яичного птицеводства опирается на максимальное использование и улучшение функциональных способностей кур-несушек для производства яиц, эффективного усвоения корма и его компонентов, адаптации к условиям содержания и противостояния инфекционным заболеваниям, включая сальмонеллез. В прошлом достаточно много изучалась взаимосвязь продуктивности и резистентности кур с особенностями экспрессии отдельных генов, вовлеченных в процессы метаболизма и работу иммунной системы птицы, или с генетическими маркерами, которые могут быть достаточно тесно связаны с этими процессами в организме кур. В настоящем исследовании были построены математические модели когерентных изменений экспрессии восьми генов иммунитета, транспорта и обмена кальция и биохимических и иммунологических показателей крови у кур-несушек в ответ на заражение сальмонеллой и скормливание фитобиотика Интебио. Предлагаемый модельный подход может стать основой для углубленного изучения взаимосвязей между функциональным состоянием птицы, воздействием патогенными микроорганизмов и применением иммуномодулирующих препаратов.

Ключевые слова: математическое моделирование, когерентные изменения, экспрессия генов, биохимические и иммунологические показатели крови, куры-несушки, *Salmonella* Enteritidis, фитобиотик

Введение

Практика яичного птицеводства опирается на максимальное использование и улучшение функциональных способностей кур-несушек для производства яиц, эффективного усвоения корма и его компонентов, адаптации к условиям содержания и противостояния инфекционным заболеваниям, включая сальмонеллез. Последний продолжает оставаться серьезной проблемой как в птицеводстве, так и в здравоохранении (Mughini-Grass et al., 2014), при этом разработка новых подходов и ветеринарных препаратов для борьбы с бактериями рода *Salmonella* остается по-прежнему актуальной (Akbari et al., 2008; Yang et al., 2015).

Общий функциональный статус организма кур описывается достаточно сложно и зависит как от генетических особенностей и генетического потенциала птицы, так и от влияния средовых факторов, испытываемых птицей в реальных условиях выращивания, содержания и кормления. Одними из важных компонентов этого функционального статуса птицы являются уровни экспрессии тех или иных генов и состояние метаболизма, о котором, в свою очередь, можно судить по биохимическим и иммунологическим показателям крови (Авзалов, 2003; Клетикова, Пронин, 2014; Топурия, 2017). При этом в ответ на различные средовые факторы в организме птицы могут активироваться или подавляться те или иные гены, соответствующие определенным метаболическим путям.

В прошлом достаточно много изучалась взаимосвязь продуктивности и резистентности кур с особенностями экспрессии отдельных генов, вовлеченных в процессы метаболизма и работу иммунной системы птицы, или с генетическими маркерами, которые могут быть достаточно тесно связаны с этими процессами в организме кур. Как пример ранних поисков связи функционирования единичных генов у домашних птиц с хозяйственно полезными признаками можно назвать изучение активности ферментов сыворотки крови. В частности, давно известен полиморфизм тканеспецифической щелочной фосфатазы, контролируемой геном *ALPL* и имеющей у кур разных пород два аллельных типа: F (*fast* ‘быстрый’) и S (*slow* ‘медленный’). При этом на электрофореграммах отмечалось, что активность быстрой доминантной зоны была в 4–5 раз выше, чем медленной рецессивной (Бондаренко, Кутнюк, 1975; Бондаренко, 1976). Под воздействием стрессовых факторов у кур-несушек наблюдалось повышение активности щелочной фосфатазы (Клетикова, Пронин, 2014). На популяционном уровне, для мониторинга популяций кур в процессе селекции и сохранения генофонда, применялись также полиморфные группы крови (6 локусов; Бондаренко, Подстрешный, 1996) и эритроцитарные антиге-

ны с определением популяционных генетическо-информационных профилей по уровню энтропии (Катеринич и др., 2014).

Недавно в работе Дубровина и др. (2019) были показаны иммуномодулирующие свойства кормовой добавки Интебио на основе эфирных масел. При добавлении Интебио в рацион кур-несушек наблюдались более эффективный запуск иммунитета, повышение иммунной резистентности и увеличение средней массы яиц. Иммунный ответ у птицы, зараженной сальмонеллой и получавшей кормовую добавку, был более выраженным, а снижение яичной продуктивности протекало более сглаженно.

Целью настоящего исследования было построение математических моделей когерентных изменений экспрессии ряда генов и биохимических и иммунологических показателей крови у кур-несушек в ответ на заражение сальмонеллой и скармливание фитобиотика Интебио по данным, полученным в работе Дубровина и др. (2019). Предлагаемый модельный подход может стать основой для углубленного изучения взаимосвязей между функциональным состоянием птицы, воздействием патогенных микроорганизмов и применением иммуномодулирующих препаратов.

Материалы и методы

В настоящей работе была предпринята попытка подобрать математические модели для того, чтобы выявить влияние заражения сальмонеллой и скармливания фитобиотика Интебио на сопряженную регуляцию генов и метаболических реакций. Для этого был проведен корреляционный анализ между данными экспрессии восьми генов иммунитета, транспорта и обмена кальция и 23 биохимическими и иммунологическими показателями крови (табл. 1), полученными для 24 кур-несушек кросса «Ломанн Уайт» в эксперименте, описанном Дубровиным и др. (2019). Вкратце опыт проводился на курах возрастом более 300 дней, которые подвергались заражению эпизоотическим штаммом *Salmonella* Enteritidis и добавлению в рацион Интебио. При этом исходили из того, что принятие в расчет обобщенных данных для всего подопытного поголовья достаточно заметно скажется на адекватности результатов корреляции. Таким образом, предполагали обеспечить гораздо большую вариабельность анализируемых данных и тем самым расширить возможности математического описания вероятных вариантов для когерентных изменений экспрессии генов и биохимических и иммунологических показателей крови, которые отражают вовлечение определенных метаболических путей в поддержание функционального состояния организма птицы.

Дифференциальную экспрессию оценивали для следующих генов иммунитета, транспорта и обмена кальция (табл. 1): *AvBD10* (β -дефенсин

10), *IL6* (интерлейкин 6), *IL8L1* (интерлейкин 8L1 (хемокин)); *SLC5A1* (натрий-глюкозный ко-транспортёр 1), *CA2* (карбоангидраза 2), *CALB1* (кальбиндин 1), *RARRES1* (респондер 1 ретиноевой кислоты 1) и *BPIFB3* (представитель 4 ВР1 фолд-содержащего семейства В). Перед началом оценки коэффициентов корреляции (r) значения экспрессии восьми изученных генов пересчитывали относительно полученных данных экспрессии «гена хозяйства» — бета-актина (Дубровин и др., 2019).

Результаты и обсуждение

В ходе корреляционного анализа были получены показатели корреляций между экспрессией генов и биохимическими и иммунологическими показателями крови, которые представлены в табл. 1.

Для последующего математического анализа были выбраны пары параметров, показавшие корреляцию не ниже 0,5 (т. е. при $r > 0,5$; табл. 1). Графические зависимости для соответствующих математических функций, отражающих попарные когерентные изменения экспрессии генов и показателей крови, представлены на рис. 1–8. К примеру, для экспрессии гена *IL8L1* данному критерию отвечают следующие биохимические и иммунологические параметры (табл. 1; рис. 1): уровни содержания мочевины ($r = -0,551$), азота мочевины ($r = -0,547$), амилазы ($r = 0,508$), глюкозы ($r = 0,752$), кальция ($r = -0,560$) и иммуноглобулинов IgA ($r = -0,647$) и IgG2 ($r = 0,850$).

Более детальный математический анализ соответственных корреляций отражают графики на рис. 1, каждый из которых был аппроксимирован наиболее точной математической зависимостью. Чтобы оценить множественную корреляцию данных параметров для *IL8L1*, значения были аппроксимированы уравнением на основе произведения степенных функций:

$$IL8L1 = 1.746U^{0.05} \cdot NU^{-0.076} \cdot Am^{-0.204} \cdot GI^{0.51} \cdot Ca^{-0.129} \cdot IgA^{-0.241} \cdot IgG2^{0.095}, \quad (1)$$

$$R^2 = 0,855,$$

где *IL8L1* — экспрессия гена *IL8L1*; *U* — содержание мочевины; *NU* — содержание азота мочевины; *Am* — активность амилазы; *GI* — содержание глюкозы; *Ca* — содержание кальция; *IgA* и *IgG2* — активность иммуноглобулинов IgA и IgG2 в крови кур-несушек.

Точность аппроксимации уравнением (1) достаточно высока ($R^2 = 0,855$) и превышает максимальную точность расчета ($R^2 = 0,785$) по единичной зависимости (рис. 1g), обеспечивая тесноту связи на уровне $R = 0,925$, в результате чего данную расчетную формулу можно принять для математического выражения скоррелированных изменений уровня экспрессии гена *IL8L1* и биохимических и иммунологических показателей крови, что в определенной степени отражает вклад этих переменных в функциональное состояние птицы.

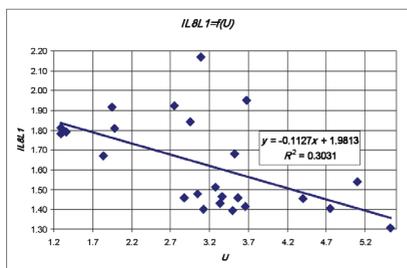
Таблица 1. Коэффициенты корреляции (r) между экспрессией генов и биохимическими и иммунологическими показателями крови (на основе данных, полученных в работе Дубровина и др. (2019))

Параметры крови	Гены										
	<i>AvBD10</i>	<i>IL6</i>	<i>IL8L1</i>	<i>SLC5A1</i>	<i>CA2</i>	<i>CALBI</i>	<i>RARRES1</i>	<i>BPIFB3</i>			
Общий белок, г/л	-0,173	0,102	-0,225	-0,369	0,183	0,187	-0,175	-0,182			
Альбумин, г/л	0,228	0,386	0,275	-0,039	-0,135	-0,292	0,068	0,005			
Глобулины, г/л	-0,242	-0,079	-0,374	0,333	0,378	0,448	-0,263	-0,128			
Мочевина, ммоль/л	-0,531*	-0,720	-0,551	-0,574	0,365	0,292	-0,581	-0,242			
Азот мочевины, ммоль/л	-0,528	-0,690	-0,547	-0,586	0,398	0,412	-0,588	-0,264			
Креатинин, ммоль/л	-0,252	-0,332	-0,286	-0,112	0,340	0,205	-0,216	0,055			
Аланинаминотрансфераза, МЕ/л	0,107	-0,314	0,051	0,030	-0,101	-0,113	0,032	-0,573			
Аспаргатаминотрансфераза, МЕ/л	-0,155	-0,326	0,494	-0,029	-0,126	-0,473	-0,116	0,294			
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	0,222	0,390	0,010	0,305	-0,214	-0,181	0,330	0,156			
Амилаза, МЕ/л	-0,002	0,239	0,508	0,606	-0,361	-0,347	0,505	0,361			
Глюкоза, ммоль/л	0,067	0,333	0,752	0,483	-0,552	-0,443	0,421	0,552			
Холестерин, ммоль/л	0,421	0,294	-0,490	-0,296	0,241	0,266	-0,068	-0,395			
Кальций, ммоль/л	0,107	0,096	-0,560	-0,566	0,291	0,380	-0,326	-0,497			
Фосфор, ммоль/л	0,396	0,218	-0,356	-0,324	-0,180	-0,043	-0,051	-0,357			
Билирубин, мкмоль/л	0,348	0,024	-0,211	0,066	-0,145	-0,148	0,194	-0,509			
Мочевая кислота, мкмоль/л	-0,017	0,390	0,044	-0,181	-0,161	-0,111	-0,048	0,226			
Лизоцимная активность, %	0,363	0,122	-0,453	-0,209	0,521	0,449	-0,185	-0,377			
Бактерицидная активность, %	0,216	0,139	0,160	0,158	-0,305	-0,068	0,175	-0,329			
Активность В-лизинов, %	0,131	-0,075	0,222	0,037	-0,358	-0,205	-0,012	-0,515			
Активность иммуноглобулина IgA	-0,136	-0,296	-0,647	-0,554	0,176	0,261	-0,384	-0,141			
IgM	0,423	0,013	-0,453	-0,424	0,349	0,287	-0,257	-0,670			
IgG1	0,420	0,392	0,190	0,057	-0,162	-0,207	0,151	0,067			
IgG2	0,220	0,408	0,850	0,605	-0,316	-0,506	0,467	0,623			

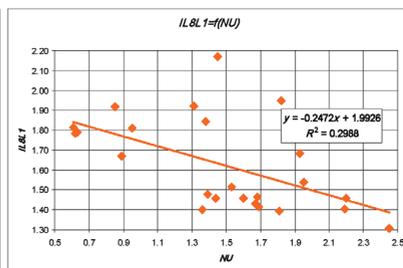
* Парные коэффициенты корреляции со значениями $r > 0,5$ выделены полужирным шрифтом.

Аналогичная математическая обработка была осуществлена и для остальных генов. При этом учитывалась возможность пересчета как для парной комбинации, так и для множественной корреляционной связи.

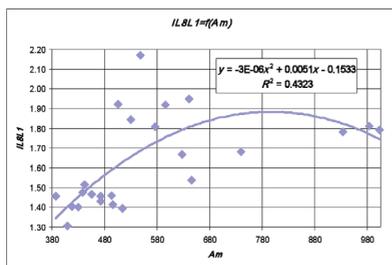
Для экспрессии гена *AvBD10* были отмечены наибольшие корреляции с показателями содержания мочевины ($r=-0,531$) и азота мочевины ($r=-0,528$; рис. 2).



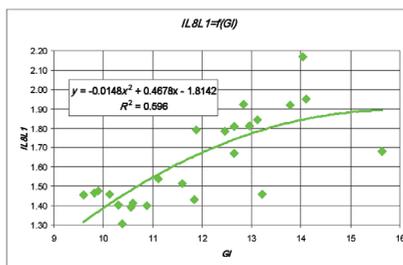
a



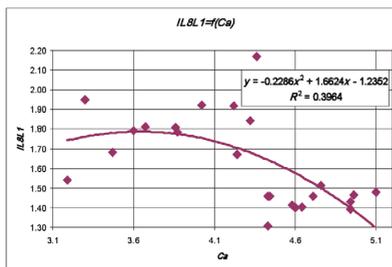
b



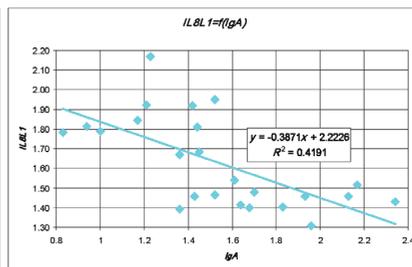
c



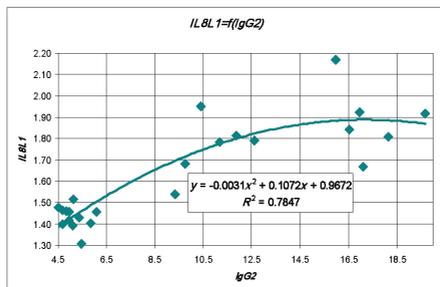
d



e

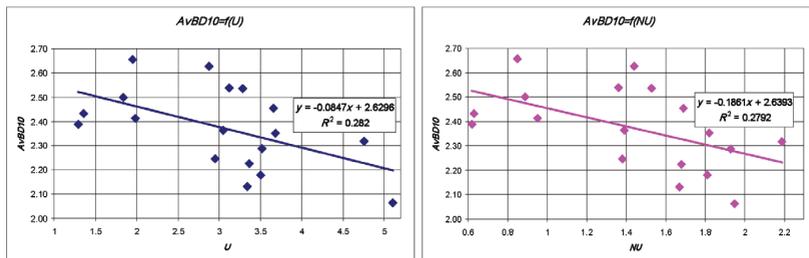


f



g

Рис. 1. Зависимость экспрессии гена *IL8L1* от содержания в крови кур-несушек: а) мочевины (*U*), б) азота мочевины (*NU*), с) амилазы (*Am*), д) глюкозы (*Gl*), е) кальция (*Ca*), иммуноглобулинов f) *IgA* и г) *IgG2*



а

б

Рис. 2. Зависимость экспрессии гена *AvBD10* от содержания: а) мочевины (*U*) и б) азота мочевины (*NU*)

С учетом характера разбega данных показателей и оценки единичных взаимосвязей экспрессии гена *AvBD10* с содержанием мочевины и азота мочевины был проведен расчет множественной корреляционной зависимости, выраженной в виде следующей формулы, в которой буквенные обозначения показателей биохимии крови аналогичны таковым в формуле (1):

$$AvBD10 = 2.433U^{-0.0009} \cdot NU^{-0.083}, \quad (2)$$

$$R^2=0,224,$$

где *AvBD10* — экспрессия гена *AvBD10*.

Точность полученной формулы (2) довольно низкая, явно уступая единичным расчетам по параметрам *U* и *NU*, тем не менее, она дает представ-

ление о степени вклада каждого из параметров в общую зависимость. Показатель степени при U достаточно мал и его вклад в объединенную множественную корреляционную зависимость составляют лишь 1%. Таким образом, можно предположить, что содержание азота мочевины является более значимым параметром для сопряженной экспрессии гена $AvBD10$.

Тем не менее мы попытались улучшить точность расчета путем подбора иных параметрических уравнений, в результате чего нижеследующая формула обеспечила более точный результат:

$$AvBD10 = 2.44 + 1.485U - 3.073NU + 0.545U \cdot NU - 0.305U^2 + 0.151NU^2, \quad (3)$$

$$R^2=0,502.$$

Уровень тесноты множественной связи экспрессии гена $AvBD10$ с показателями содержания в крови мочевины и азота мочевины составил $R=0,709$, в результате чего расчетную формулу (3) можно принять для выражения согласованных изменений данных показателей функционального состояния птицы.

Аналогично гену $AvBD10$, для гена $IL6$ также отмечены наивысшие корреляционные связи с содержанием мочевины ($r=-0,720$) и азота мочевины ($r=-0,690$; рис. 3).

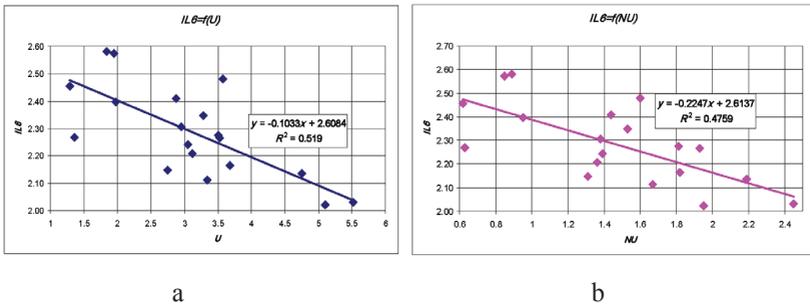


Рис. 3. Зависимость экспрессии гена $IL6$ от содержания: а) мочевины (U) и б) азота мочевины (NU)

Анализ множественной корреляции для $IL6$, выполненный аналогично расчету экспрессии гена $AvBD10$, дал возможность сравнить два типа расчетных формул:

$$IL6 = 2.735U^{-0.191} \cdot NU^{0.077}, \quad (4)$$

$$R^2=0,449$$

и

$$IL6 = 2.541 + 0.35U - 0.88NU + 0.12U \cdot NU - 0.082U^2 + 0.095NU^2, \quad (5)$$

$$R^2=0,538,$$

где $IL6$ — экспрессия гена $IL6$.

Из этих уравнений формула (5) оказалась более точной (теснота связи параметров $R=0,733$), в результате чего данная формула принята для описания когерентных изменений этих коррелирующих между собой показателей функционального статуса кур-несушек.

Экспрессия гена *SLC5A1* наиболее связана со следующими биохимическими и иммунологическими показателями крови исследуемых птиц (рис. 4): содержанием мочевины ($r=-0,574$), азота мочевины ($r=-0,586$), амилазы ($r=0,606$), кальция ($r=-0,566$) и активности иммуноглобулинов IgA ($r=-0,554$) и IgG2 ($r=-0,605$).

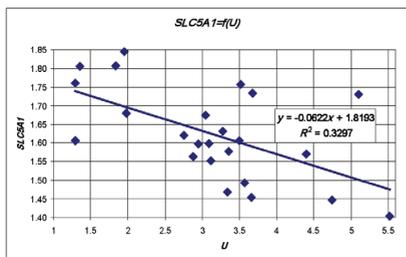
Уравнение множественной регрессии позволило повысить точность расчета экспрессии гена *SLC5A1* ($R=0,746$) после аппроксимации экспериментальных данных следующей зависимостью:

$$SLC5A1 = 1.512U^{-0.095} \cdot NU^{0.035} \cdot Am^{-0.043} \cdot Ca^{-0.155} \cdot IgA^{0.052} \cdot IgG2^{0.045}, \quad (6)$$

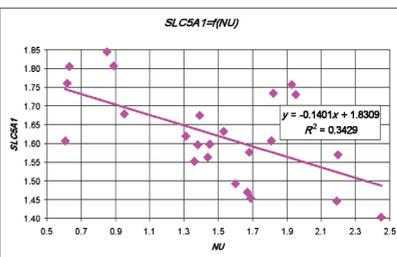
$$R^2=0,556,$$

где *SLC5A1* — экспрессия гена *SLC5A1*.

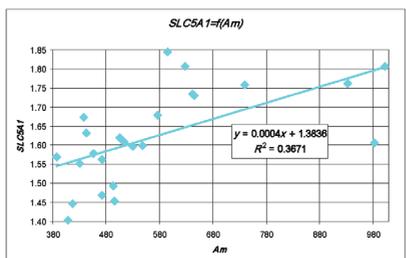
Корреляционный анализ экспрессии гена *CA2* выявил его взаимосвязь с содержанием глюкозы ($r=-0,552$) и лизоцимной активностью ($r=0,521$; рис. 5).



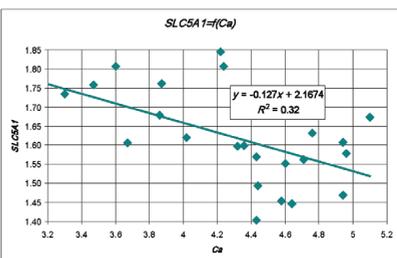
a



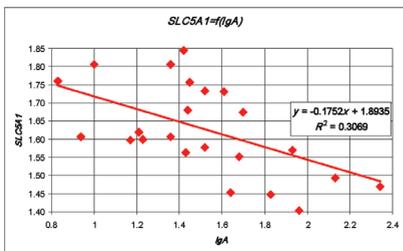
b



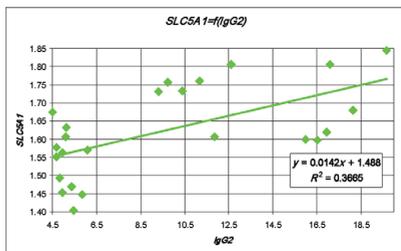
c



d



e



f

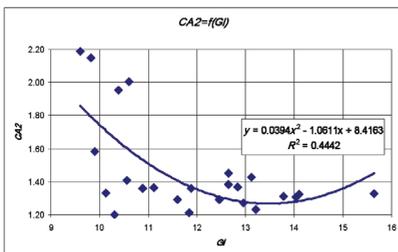
Рис. 4. Зависимость экспрессии гена *SLC5A1* от содержания: а) мочевины (*U*), б) азота мочевины (*NU*), с) амилазы (*Am*), d) кальция (*Ca*) и иммуноглобулинов е) IgA и f) IgG2

Анализ тесноты множественной взаимосвязи между данными параметрами ($R=0,720$) позволил остановиться на следующей расчетной формуле, показавшей наиболее высокую точность:

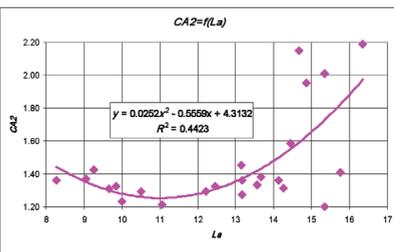
$$CA2 = 3.079 - 0.191Gl - 0.084La - 0.015Gl \cdot La + 0.014Gl^2 + 0.012La^2, \quad (7)$$

$$R^2=0,518,$$

где *CA2* — экспрессия гена *CA2*; *La* — уровень лизоцимной активности.



a



b

Рис. 5. Зависимость экспрессии гена *CA2* от: а) содержания глюкозы (*Gl*) и б) лизоцимной активности (*La*)

Анализ экспрессии гена *CALB1* выявил его относительно сильную корреляцию всего лишь с одним иммунологическим параметром крови — активностью иммуноглобулина IgG2 ($r=-0,506$; рис. 6).

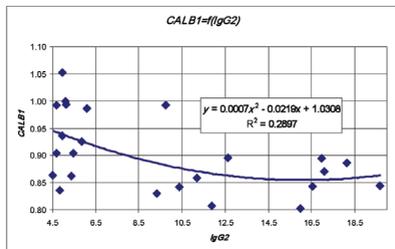


Рис. 6. Зависимость экспрессии гена *CALB1* от активности иммуноглобулина *IgG2*

Полученная расчетная формула не слишком точна ($R=0,538$), и, скорее всего, ее использование возможно лишь для приблизительной оценки скоррелированных изменений экспрессии данного гена и активности иммуноглобулина *IgG2*:

$$CALB1 = 0.0007Ig2^2 - 0.0219IgG2 + 1.0308, \quad (8)$$

$$R^2=0,290,$$

где *CALB1* — экспрессия гена *CALB1*.

Корреляционный анализ зависимости экспрессии гена *RARRES1* от показателей биохимии крови позволил отобрать его наивысшие связи с содержанием мочевины ($r=-0,581$), азота мочевины ($r=-0,588$) и амилазы ($r=0,505$; рис. 7).

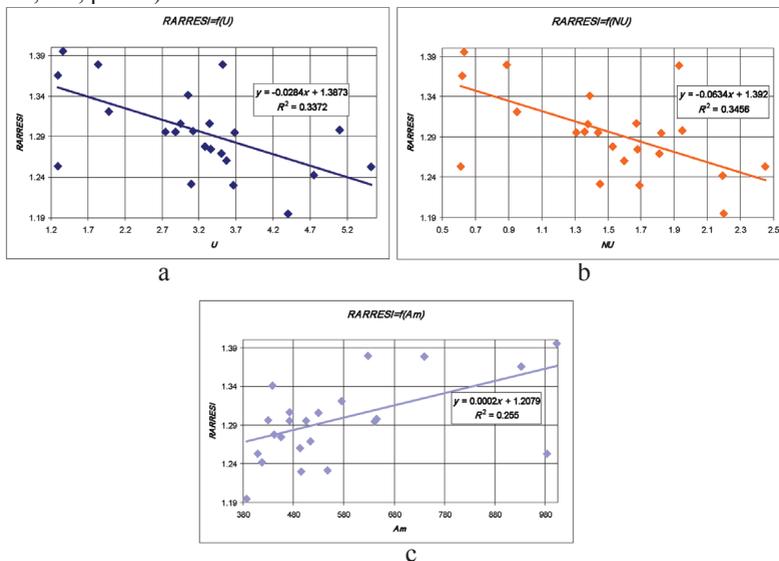


Рис. 7. Зависимость экспрессии гена *RARRES1* от содержания: а) мочевины (*U*), б) азота мочевины (*NU*) и с) амилазы (*Am*)

Множественная корреляция между отмеченными параметрами, описанная произведением степенных функций, была выражена в виде следующей формулы, которая оказалась наиболее точной, обеспечивая тесноту связи между данными величинами на уровне $R=0,829$:

$$RARRESI = 3.127 - 0.187U - 0.849NU - 0.003Am + 0.099U \cdot NU + 0.000075U \cdot Am + 0.00086NU \cdot Am - 0.0075U^2 + 0.0174NU^2 + 0.000001Am^2, \quad (9)$$

$$R^2=0,688,$$

где $RARRESI$ — экспрессия гена $RARRESI$.

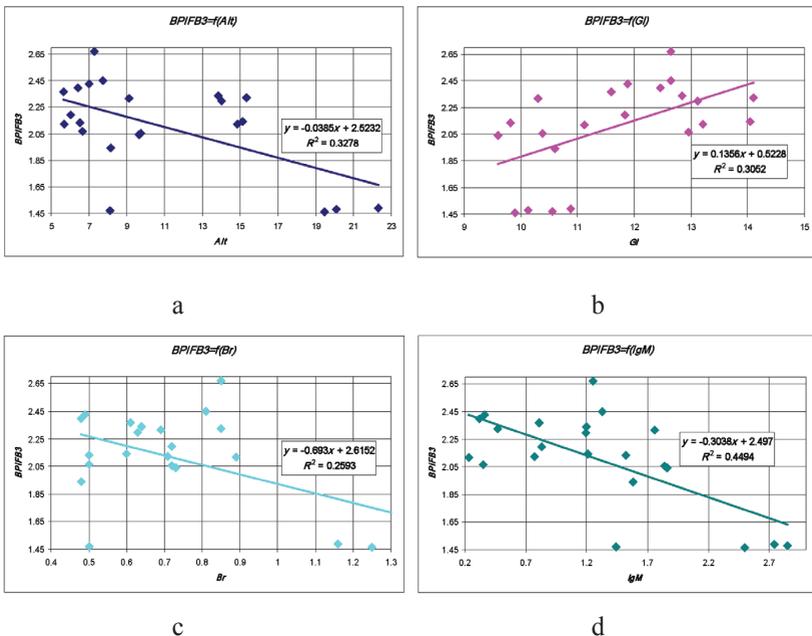
Относительно высокие корреляции гена $BPIFB3$ были выявлены со следующими биохимическими и иммунологическими показателями крови (рис. 8): содержанием аланинаминотрансферазы ($r=-0,573$), глюкозы ($r=0,552$), билирубина ($r=-0,509$), активностью иммуноглобулинов IgM ($r=-0,670$), IgG2 ($r=0,623$) и β -лизина ($r=-0.515$).

Анализ тесноты множественной взаимосвязи между данными параметрами, позволил вывести следующую расчетную формулу:

$$BPIFB3 = 14.924Alt^{-0.04} \cdot GI^{0.592} \cdot Br^{0.024} \cdot IgM^{-0.028} \cdot IgG2^{0.079} \cdot Bla^{-0.835}, \quad (10)$$

$$R^2=0,758$$

где $BPIFB3$ — экспрессия гена $BPIFB3$; Alt — активность аланинаминотрансферазы; Br — содержание билирубина; IgM — активность иммуноглобулина IgM и Bla — активность β -лизина.



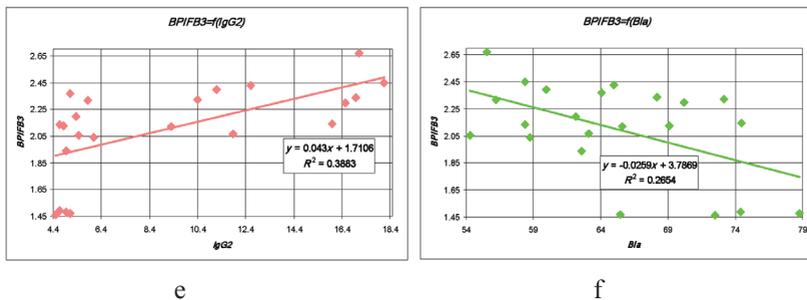


Рис. 8. Зависимость экспрессии гена *BPIFB3* от показателей: а) содержания аланинаминотрансферазы (*ALT*), б) глюкозы (*Gl*), в) билирубина (*BR*), активности иммуноглобулинов д) *IgM* и е) *IgG2* и ф) активности β -лизина (*Bla*)

Формула (10) по своей точности превышает аккуратность расчетов с использованием единичных взаимосвязей, обеспечивая тесноту множественной связи на уровне $R=0,870$, и может быть взята за основу для характеристики сопряженных изменений экспрессии гена *BPIFB3* и коррелирующих с ней биохимических и иммунологических показателей крови.

Использование на практике уравнений регрессии, дает возможность достаточно точного определения корреляции согласованных изменений экспрессии генов и различных биохимических и иммунологических показателей крови ($R=0,709 \dots 0,937$), за исключением гена *CALBI* ($R=0,538$), для которого удалось установить лишь корреляцию с единственным параметром биохимии крови (табл. 2). Возможно, в будущем следует провести дополнительное изучение особенностей экспрессии данного гена на фоне изменения тех или иных компонентов функционального статуса птицы.

Таблица 2. Точность расчета взаимосвязи экспрессии генов с биохимическими и иммунологическими показателями крови на основании их множественной (или единичной) корреляции

Гены	Коррелирующие показатели крови	Точность расчета (R^2)	Теснота взаимосвязи (R)
<i>AvBD10</i>	<i>U, NU</i>	0,502	0,709
<i>IL6</i>	<i>U, NU</i>	0,538	0,733
<i>IL8L1</i>	<i>U, NU, Am, Gl, Ca, IgA, IgG2</i>	0,855	0,925

Гены	Коррелирующие показатели крови	Точность расчета (R^2)	Теснота взаимосвязи (R)
<i>SLC5A1</i>	<i>U, NU, Am, Ca, IgA, IgG2</i>	0,556	0,746
<i>CA2</i>	<i>Gl, La</i>	0,518	0,720
<i>CALB1</i>	<i>IgG2</i>	0,290*	0,538*
<i>RARRES1</i>	<i>U, NU, Am</i>	0,688	0,829
<i>BPIFB3</i>	<i>Alt, Gl, Br, Bla, IgM, IgG2</i>	0,758	0,870

U — содержание мочевины; *NU* — содержание азота мочевины; *Am* — активность амилазы; *Gl* — содержание глюкозы; *Ch* — содержание холестерина; *Ca* — содержание кальция; *La* — лизоцимная активность; *Br* — содержание билирубина; *Bla* — активность β -лизина; *IgA*, *IgG2* и *IgM* — активность иммуноглобулинов IgA, IgG2 и IgM в крови кур-несушек. * Единичная парная корреляция.

Заключение

Наиболее информативными биохимическими и иммунологическими показателями крови оказались содержание мочевины, азота мочевины, глюкозы и активность иммуноглобулина IgG2, которые наиболее выражено коррелировали с когерентными изменениями в экспрессии восьми генов, исследованных в данном эксперименте. Это может послужить основой для дальнейшего более глубокого изучения биологической взаимосвязи биохимических и иммунологических показателей крови с генетическими параметрами, что приблизит к пониманию более полной картины о различных компонентах, обеспечивающих функциональное состояние организма кур (Авзалов, 2003; Топурия, 2017).

В целом полученные результаты математического моделирования могут представлять, как практический интерес, так и стать предпосылкой для более тщательного изучения взаимосвязей между экспрессией генов и биохимическими и иммунологическими показателями крови исследуемых биологических организмов, особенно в условиях инфицирования сальмонеллой и других патогенными микроорганизмами, а также при тестировании ветеринарных препаратов, способных улучшить резистентность и продуктивность птицы.

Благодарности

Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

Авторы благодарят Г.Ю. Лаптева и ООО «БИОТРОФ+» (Санкт-Петербург) за первичные данные, полученные в исследовании Дубровина и др. (2019) и использованные для разработки предлагаемой математической модели.

ЛИТЕРАТУРА

Авзалов Р.Х. Гематологические и иммунологические показатели кур в различные возрастные периоды в зависимости от применения биологически активных препаратов // Вестник Оренбургского государственного университета. 2003. Т. 5. № 6. С. 156–160.

Бондаренко Ю.В. Генетический полиморфизм яичных и сывороточных белков кур в связи с направлением селекции и уровнем продуктивности: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15. Харьков, 1976. 196 с.

Бондаренко Ю.В., Кутнок П.И. Генетический полиморфизм домашних кур и индеек по щелочной фосфатазе плазмы // Тезисы докл. XIX конф. молод. ученых и аспирантов по птицеводству (Загорск, 1975 г.). М., 1975. С. 14–15.

Бондаренко Ю.В., Подстрешный А.П. Генетический мониторинг популяции кур // Молекулярно-генетические маркеры животных: тезисы докл. II Междунар. конф. по молек.-генетич. маркерам животных (Киев, 15–17 мая 1996 г.). К.: Аграрная наука, 1996. С. 47–48.

Дубровин А.В., Ильина Л.А., Новикова О.Б. Влияние кормовой добавки на основе эфирных масел на яичную продуктивность и иммунный ответ кур-несушек при заражении эпизоотическим штаммом *Salmonella enteritidis* // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. 2019. № 1 (54). С. 107–111.

Клетикова Л.В., Пронин В.В. Биохимический статус крови кур кросса «Хайсекс Браун» при выращивании на высокотехнологичном предприятии // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2014. № 1. С. 5–6.

Топурия Л. Ю. Функциональное состояние организма перепелов под влиянием Гермивита // Аграрный вестник Урала. 2017. № 13 (167). С. 12–15.

Катеринич О.О., Ткачик Т.Е., Бондаренко Ю.В. Методичні підходи щодо створення генетико-інформаційного профілю імуногенетичної структури м'ясо-яєчних курей // Сучасне птахівництво. 2014. № 3. С. 12–13.

Akbari M. R., Haghghi H. R., Chambers J. R., Brisbin J., Read L. R., Sharif S. Expression of antimicrobial peptides in cecal tonsils of chickens treated with probiotics and infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // Clinical and Vaccine Immunology. 2008. Vol. 15. No. 11. P. 1689–1693.

Mughini-Gras L., Enserink R., Friesema I., Heck M., van Duynhoven Y., van Pelt W. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis // PLoS One. 2014. Vol. 9. No. 9. P. e87933.

Yang C., Chowdhury M.A., Huo Y., Gong J. Phytogenic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application // Pathogens. 2015. Vol. 4. No. 1. P. 137–156.

Analysis of coherent changes in gene expression and blood biochemical parameters in an experiment on laying hens

Narushin V.G.,¹ Selina M.V.,² Romanov M.N.^{2,3}

¹Vita-Market Ltd, Zaporozhye, Ukraine;

²K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

³University of Kent, Canterbury, UK.

Abstract

The practice of egg poultry farming is based on the maximum use and improvement of the functional abilities of laying hens for the production of eggs, the effective intake of feed and its components, adaptation to the housing conditions and the resistance to infectious diseases including salmonellosis. In the past, the relationship between the productivity and resistance of chickens with the peculiarities of the expression of individual genes involved in the metabolism and the immune system of the birds, or with genetic markers, which can be quite closely associated with these processes in the chicken body, has been studied a lot. In this study, mathematical models of coherent changes in the expression of eight genes of immunity, calcium transport and metabolism, and biochemical/immunological blood parameters in laying hens in response to *Salmonella* infection and feeding the phytobiotic Intebio were built. The proposed model approach can become the basis for an in-depth study of the relationships between the functional state of the birds, exposure to pathogenic microorganisms and the use of immunomodulating drugs.

Key words: mathematical modeling, coherent changes, gene expression, blood biochemical and immunological parameters, laying hens, *Salmonella* Enteritidis, phytobiotic

Исследование влияния кормовой добавки на основе эфирных масел на показатели иммунитета кур-несушек

Дубровин А.В.,¹ Лаптев Г.Ю.,¹ Ильина Л.А.,¹ Филиппова В.А.,¹ Йылдырым Е.А.,¹ Новикова О.Б.,² Кочиш И.И.³

¹ ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – Филиал ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Санкт-Петербург, Ломоносов, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

Email: dubrovin@biotrof.ru

Аннотация

В статье приведены результаты исследования влияния кормовой добавки на основе эфирных масел Интебио® на яйценоскость и иммунологические показатели кур-несушек кросса «Ломанн белый». Опыт был поставлен на взрослых курах-несушках с применением данной кормовой добавки, а также с заражением части поголовья птицы эпизоотическим штаммом *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Спустя сутки и неделю после заражения проводился плановый забой птицы с отбором образцов на лабораторный анализ. В результате исследования были выявлены различия в уровне яйценоскости и некоторых иммунологических показателей между группами исследованных птиц. Было обнаружено, что добавление в рацион кур-несушек кормовой добавки на основе эфирных масел приводило к увеличению среднего веса яиц, а также повышению активности иммунитета. После заражения у птицы, получавшей кормовую добавку, также отмечалось менее выраженное снижение яйценоскости при более выраженных признаках запуска иммунного ответа.

Ключевые слова: куры-несушки, кормовые добавки, эфирные масла, яйценоскость, иммунитет

Введение

Подход к выращиванию сельскохозяйственной птицы долгое время был достаточно упрощенным. В погоне за объемами продукции многие факторы здорового развития организма не учитывались, при этом возникающие проблемы, вызванные бактериальными или вирусными инфекциями, токсическими отравлениями, дисбактериозом и т. п., решались и решаются до сих пор быстро и однообразно при помощи лекарственных или химических препаратов, хотя далеко не все представители нормальной микрофлоры с ними совместимы [1, 4]. Желудочно-кишечный тракт сельскохозяйственных животных и птиц играет важнейшую роль в поддержании иммунной защиты организма, поскольку представляет собой передовую линию столкновения с различными патогенами, поступающими с кормом и способными колонизировать клетки и ткани хозяина [5]. На сегодняшний день известно, что организм отвечает на то или иное воздействие, в том числе и через экспрессию генов — процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК и белок [7]. Важную роль в противостоянии инфекциям играют также антимикробные пептиды: дефензины, хемокины, цитокины и др. Одним из решений является применение кормовых добавок, поддерживающих развитие нормальной микрофлоры и направленных на стимуляцию иммунитета. Интебио® — это кормовая добавка, основанная на смеси натуральных эфирных масел, которые в составе препарата обладают антимикробной активностью, антиоксидантным действием и противовоспалительным эффектом.

Целью нашей работы было изучение влияния кормовой добавки на основе смеси эфирных масел Интебио® на здоровье и продуктивность кур-несушек. Был также проведен анализ действия данного препарата при заражении птицы эпизоотическим штаммом *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE), так как сальмонеллез является одной из наиболее частых инфекционных болезней в птицеводстве [2].

Материалы и методы

Экспериментальная часть исследования проходила в условиях вивария ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – Филиала ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, где был поставлен опыт на взрослых курах-несушках с применением кормовой добавки на основе эфирных масел Интебио®.

Исследуемая птица — взрослые куры несушки кросса «Ломанн белый» возрастом более 300 дней в количестве 40 голов содержали с раз-

делением на группы-аналоги: контрольная и опытная. Опытная группа получала кормовую добавку Интебио® с первого дня опыта. При этом, вся птица вместе с кормом получала кормовой антибиотик Стафак 110. Через 3 недели после начала опыта, половина поголовья каждой группы была заражена эпизоотическим штаммом SE в количестве 5×10^8 КОЕ в грудную мышцу, после чего было произведено дальнейшее разделение на группы: контроль, зараженный контроль, опыт, зараженный опыт. Отбор проб крови проводился спустя сутки и спустя неделю после заражения. Ежедневно проводился контроль веса яиц.

Лабораторное исследование проб крови выполнялось в ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», где были проведены анализы иммунологических показателей крови. Бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) определялась по методу Теффера в модификации Смирновой и Кузьминой. Активность β -лизина в сыворотке крови птиц определялась фотоэлектроколориметрическим методом по Бухарину [6]. Определение классов иммуноглобулинов методом дискретного осаждения проводилось по Костине [3].

Лабораторное исследование проводилось в молекулярно-генетической лаборатории компании ООО «БИОТРОФ+». Тотальная РНК из образцов была выделена с помощью набора Aurum Total RNA (BioRad, США) согласно инструкции производителя. При помощи набора iScript RT Supermix (BioRad, США) была проведена реакция обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК. Реакция амплификации проводилась при помощи набора SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad, США) согласно протоколу производителя.

Результаты и обсуждение

Показатели яичной продуктивности продемонстрированы на рис. 1 и в табл. 1, из которых видно, что на протяжении опыта в целом средний вес яиц был наиболее высоким в опытной группе, получавшей кормовую добавку на основе смеси эфирных масел.

Среди зараженных групп пик снижения яичной продуктивности был отмечен через 2 дня после заражения. Средний вес яиц в опытной заражённой группе в день пика снижения яйценоскости упал на 5,6% в сравнении с опытной интактной группой. В то же время в заражённой контрольной группе упал на 10% в сравнении с контрольной интактной группой. В среднем после заражения в обеих группах вес яиц упал на 3% в сравнении с интактными аналогами. Стоит отметить, что в контрольной группе значительно чаще, чем в опытной отмечались случаи расклева яиц.

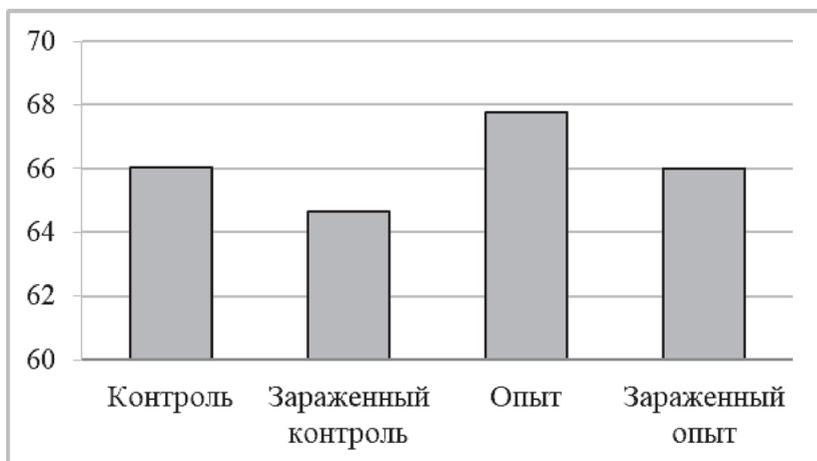


Рис. 1. Средний вес яиц в течение недели после заражения птицы

Таблица 1. Средние показатели яйценоскости кур за период опыта

Группа	Общий средний вес яиц, г	Средний вес яиц до заражения, г	Средний вес яиц после заражения, г
Контроль	64,80	64,36	66,04
Контроль + SE	64,66	–	64,66
Интебио®	66,45	65,98	67,78
Интебио® + SE	65,99	–	65,99

На рис. 2а и 2б представлены результаты анализа БАСК и активности β -лизинов сыворотки крови. БАСК является интегративным фактором естественной резистентности гуморального типа, свидетельствующим о способности крови к самоочищению. В контрольной группе уровень БАСК снизился после заражения патогенным штаммом SE, в то время как в опытной группе уровень БАСК после заражения повысился в сравнении с аналогичными группами без заражения. При этом в контрольной зараженной группе спустя неделю уровень БАСК снизился еще сильнее, в то время как в опытной группе он поднялся.

β -лизины — это катионные сывороточные белки, которые продуцируют тромбоциты и обладают бактерицидной активностью к аэробным спорообразующим бактериям. Результаты анализа показали так же, что после заражения у контрольной группы наблюдалось снижение активности β -лизинов в сравнении с контрольной интактной группой, в то время как у опытной группы уровень активности β -лизинов после заражения повышался и продолжал повышаться спустя неделю после заражения.

Иммуноглобулины классов IgA, IgM, IgG1, IgG2 — это гликопротеины, которые играют важную роль в работе врожденного иммунитета. Они вырабатываются в ответ на воздействие антигенов бактерий, вирусов, микромицетов, простейших и т. д.

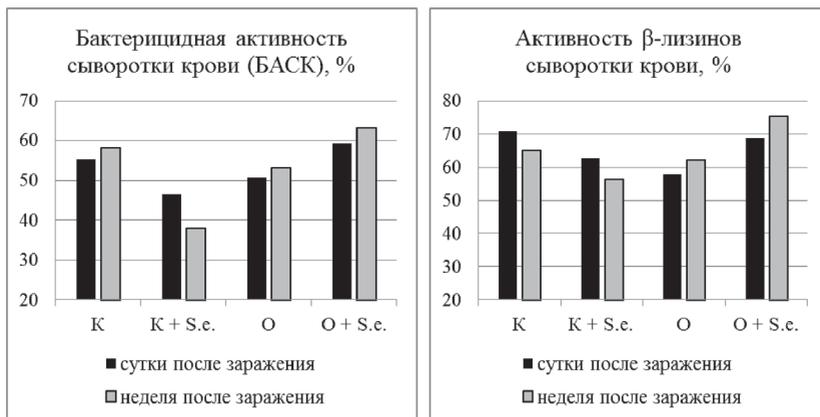


Рис. 2. А — бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК, %); Б — активность β-лизинов сыворотки крови (%) в подгруппах: К + S.e. — контрольная подгруппа, зараженная SE; О + S.e. — опытная подгруппа, зараженная SE; О — опытная интактная подгруппа

На рис. 3а и 3б показаны данные по содержанию в сыворотке крови иммуноглобулинов IgA и IgM. Данные анализа показали, что содержание IgA в опытных группах было более стабильным, чем в контрольных, причем как среди зараженной, так и среди незараженной птицы.

Анализ содержания в крови IgM показал, что в зараженных группах через сутки после заражения отмечалось значительное снижение в сыворотке крови IgM, а через неделю после заражения — значительное повышение. При этом уровень данного иммуноглобулина в зараженной опытной группе спустя неделю оказался выше, чем в зараженной контрольной группе. Среди незараженных птиц опытная группа показала более высокую стабильность в содержании IgM, чем контрольная группа.

Через сутки после заражения птицы уровень экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе, различался в зависимости от группы. Результаты исследования экспрессии в тканях слепых отростков кур-несушек показаны в рис. 4.

Интерлейкин 6 (IL6) — это противовоспалительный цитокин (относится к сигнальным молекулам). Основная функция сигнальных моле-

кул — привлечение дополнительных лейкоцитов из кровооборота к месту инфекции, чтобы повысить сопротивление эпителиальных клеток инфекции. По результатам наших исследований с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что в контрольной заражённой группе через сутки после инфицирования SE было отмечено снижение уровня экспрессии гена *IL6* в сравнении с контрольной интактной группой более чем в 2 раза.

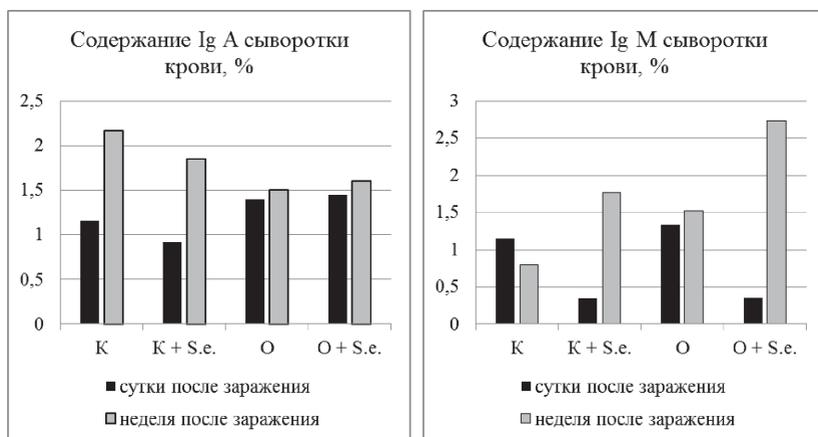


Рис. 3. А — содержание IgA сыворотки крови (%); Б — содержание IgM сыворотки крови (%) в подгруппах: К + S.e. — контрольная подгруппа, зараженная SE; О + S.e. — опытная подгруппа, зараженная SE; О — опытная интактная подгруппа

При этом в опытной группе, получавшей кормовую добавку Интебио®, после заражения штаммом SE экспрессия гена *IL6* значительно повысилась в сравнении с интактным аналогом, а также была выше уровня контрольной интактной группы в 1,78 раза. Данная тенденция сохранилась и спустя 7 суток после заражения. Тот факт, что уровень экспрессии гена *IL6* был наименьшим в опытной интактной группе спустя сутки после заражения, представляется авторам логичным и может быть обусловлен отсутствием течения воспалительных процессов. При этом повышение экспрессии данного гена в заражённой опытной группе свидетельствует об активной реакции организма в ответ на внедрение возбудителя. При этом понижение экспрессии данного гена в контрольной заражённой группе в сравнении с интактным аналогом, вероятно, свидетельствует об ослабленной иммунной реакции.

Согласно исследованиям предыдущих авторов [8, 9] в норме после заражения кур сальмонеллой наблюдается увеличение количества цитокинов и иммунных белков, таких как IL1 β , IL6, IL8, IL12, IL17, IL18, IL22, IL23, IFN γ , LITAF.

Галлинацин-10 (AvBD10) — это β -дефензин, который играет жизненно важную роль во врожденном иммунном ответе на бактериальные инфекции. Иммунные клетки используют дефензины для уничтожения бактерий, поглощённых при фагоцитозе. β -дефензины обнаруживаются в лейкоцитах и эпителиальных клетках. Экспрессия гена *AvBD10* спустя сутки после заражения во всех группах была ниже уровня контроля, что скорее может быть обусловлено повышением уровня экспрессии в контрольной группе. При этом тенденция отношения экспрессии *AvBD10* после инфицирования штаммом SE между контрольной заражённой и двумя опытными группами коррелирует с показателями экспрессии гена *IL6* спустя сутки после заражения.

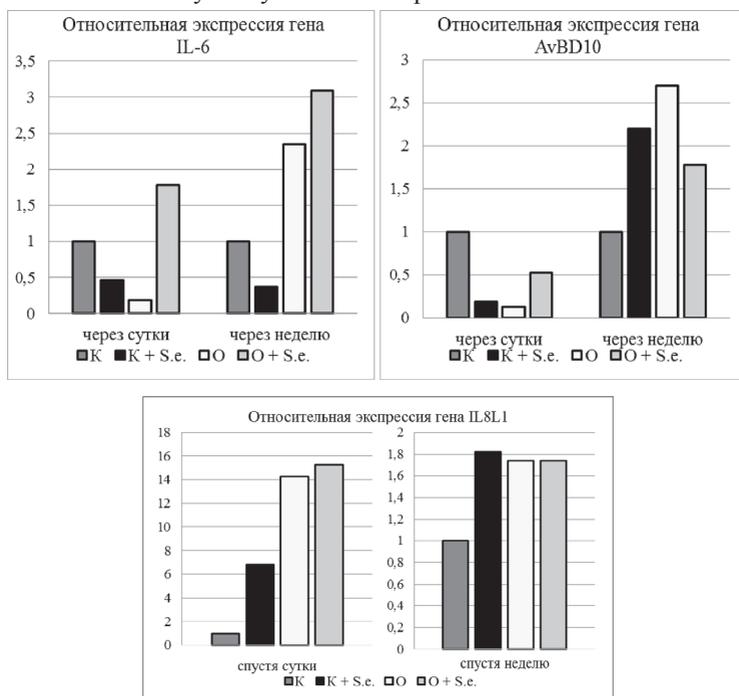


Рис. 4. Относительная экспрессия некоторых генов, участвующих в иммунном ответе исследованных птиц, в подгруппах: K + S.e. — контрольная подгруппа, зараженная SE; O + S.e. — опытная подгруппа, зараженная SE; O — опытная интактная подгруппа

Спустя неделю после заражения было отмечено повышение экспрессии гена *AvBD10* во всех группах относительно контроля. Вероятным также представляется предположение о том, что активация данного гена происходила позднее, чем через сутки после заражения сальмонеллой.

Ген *IL8LI* связан с синтезом хемокина, принимающего участие в передаче сигналов между иммунными клетками [10]. Спустя сутки после заражения штаммом SE во всех опытных вариантах уровень экспрессии *IL8LI* по сравнению с контролем был значительно выше. Экспрессия гена *IL8LI* в контрольной зараженной группе была в 7 раз выше по сравнению с интактным контролем. При этом экспрессия в опытной группе в сравнении с чистым контролем была выше в 14 раз в интактной группе и в 15 раз — в зараженной группе. Через 7 суток после заражения SE наблюдалось выравнивание уровня экспрессии гена *IL8LI* между опытными группами. Высокий уровень экспрессии гена *IL8LI* в опытной незаражённой группе представляется логичным, поскольку в связи с функцией данного гена, повышенная его экспрессия может свидетельствовать о более высокой готовности организма проявлять иммунный ответ в случае попадания возбудителей заболеваний.

Полученные данные могут свидетельствовать, что при применении кормовой добавки на основе эфирных масел организм птицы не подверженной заражению находился в более стабильном состоянии с признаками более высокой готовности к иммунному ответу, а спустя сутки после заражения штаммом SE наблюдался более эффективный запуск иммунного ответа. О более стабильном состоянии кур, получавших кормовую добавку, также свидетельствовал более высокий средний вес яиц как в зараженной, так и в незараженной группах.

Заключение

Таким образом, данные результаты могут свидетельствовать об иммуномодулирующих свойствах кормовой добавки, так как под её воздействием наблюдалась более высокая напряженность иммунитета, лучшая сопротивляемость к введению инфекционного возбудителя. При этом повышение показателей иммунитета сопровождалось повышением продуктивности по весу яиц, что вносит полезные сведения о действии кормовой добавки на основе смеси эфирных масел на организм птицы.

Исследование выполнено при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия / АН СССР. М.: Наука, 1989. 256 с.
2. Грозина А.А. Состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят-бройлеров при воздействии пробиотика и антибиотика (по данным T-RFLP-RT-PCR) // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 6. С. 46–58.
3. Караулов А.К., Петрова О.Н., Варкентин А.В., Бардина Н.С., Семенова Н.А., Баташова Д.С., Коренной Ф.И. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации. 2018 год. Владимир: ФГБУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления ветнадзора, 2019.
4. Костина М. А. Определение классов иммуноглобулинов методом дискретного осаждения // Проблемы повышения резистентности новорожденных животных: сб. научн. тр. ВНИИНБЖ. Воронеж, 1983. С. 76–80.
5. Лаптев Г. Кормление животных и микрофлора // Животноводство России. 2010. № 2. С. 56–57.
6. Садовников Н.В., Придыбайло Н.Д., Верещак Н.А., Заслонов А.С. Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов. Екатеринбург–СПб.: Уральская ГСХА, НПП «АВИВАК», 2009. С. 18–25.
7. Фисинин В.И., Сурай П. Кишечный иммунитет у птиц: факты и размышления (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 4. С. 3–25.
8. Berndt A., Wilhelm A., Jugert C., Pieper J., Sachse K., Methner U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness // Infection and Immunity. 2007. Vol. 75. No. 12. P. 5993–6007.
9. Crhanova M., Hradecka H., Faldynova M., Matulova M., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection // Infection and Immunity. 2011. Vol. 79. No. 7. P. 2755–2763.
10. Moser B., Wolf M., Walz A., Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control // Trends in Immunology. 2004. Vol. 25. No. 2. P. 75–84.

Study of the of essential oils-based feed additive influence on the immunological markers of laying hens

Dubrovin A.V.,¹ Laptev G. Yu.,¹ Ilina L.A.,¹ Filippova V.A.,¹ Yildirim E.A.,¹ Novikova O.B.,² Kochish I.I.³

¹ OOO BIOTROF+, St Petersburg, Russia;

² All-Russian Veterinary Research Institute of Poultry Science—Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Centre ‘All-Russian Poultry Research and Technological Institute’ of the Russian Academy of Sciences, Lomonosov, St. Petersburg, Russia;

³ K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia.

Abstract

The article presents the results of studying effects of the essential oils-based feed additive Intebio® on egg production and immunological parameters of Lohmann White laying hens. An experiment was set up on adult laying hens using the essential oils-based feed additive. Infection the part of poultry population with an epizootic strain of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is also was carried out. In one day and one week after infection, a planned slaughter of the birds with sampling for laboratory analysis was carried out. As a result of the examination, differences in egg production and immunological parameters between the experimental groups were identified. It was found that the addition of the essential oil-based feed additive to the feed of laying hens led to an increase in the average eggs weight and increase of immunity activity. Also, after infection in hens that received a feed additive, a less expressed decrease in egg production, with more expressed signs of an immune response, were found as compared with the control infected group.

Key words: laying hens, feed additives, essential oils, egg production, immunity

УДК 636.5.087.8

Влияние фитобиотика Интебио на экспрессию генов продуктивности и иммунитета у кур-несушек

Кочиш И.И.,¹ Мясникова О.В.,¹ Мартынов В.В.²

¹ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

²ГОУ ВО Московской области «Московский государственный областной университет», Москва, Россия

E-mail: omyasnikova71@gmail.com

Аннотация

В статье представлены исследования оценки экспрессии генов продуктивности и иммунитета у кур-несушек на фоне скармливания курам фитобиотика Интебио на основе эфирных масел и рассмотрена его возможность применения в яичном птицеводстве в качестве альтернативы антибиотикам.

Ключевые слова: экспрессия генов, продуктивность кур-несушек, фитобиотики, запрет антибиотиков

Повышение продуктивности в высокоинтенсивном птицеводстве является приоритетной задачей. При этом инфекционные заболевания, возбудителями которых являются различные группы микроорганизмов, являются основной причиной снижения продуктивности у кур-несушек, наряду с неправильным кормлением. Традиционно для борьбы с бактериальными инфекциями в ветеринарной практике применяются антибиотики. Современные антибиотики обладают бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, хламидий (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*) и микоплазм (*M. pneumoniae*). В тоже время антибиотики обладают рядом нежелательных побочных действий. В результате их применения угнетается микрофлора желудочно-кишечного тракта, ослабляется иммунитет, патогенные микроорганизмы мутируют, развивается их антибиотикоустойчивость. Это

делает дальнейшее использование антибиотиков неэффективным. При этом определенные количества препаратов накапливаются в продуктах птицеводства, представляя опасность для человека [1]. Подобные негативы использования химических препаратов, как известно, уже послужили причиной запрета большинства из них в США и странах Западной Европы [2].

С каждым годом растет спрос на органическую продукцию, в том числе в птицеводстве, поэтому применение препаратов, улучшающих качество сырья продуктов его переработки и не представляющих вреда для здоровья человека, имеет безусловно большой практический интерес как для самих производителей, так и для потребителей [6, 7].

С учетом вышесказанного в современном птицеводстве возникла потребность в создании новых антибактериальных препаратов, которые будут лишены вышеперечисленных недостатков [1, 3]. Одним из таких новых препаратов является фитобиотик Интебио, который представляет собой смесь натуральных эфирных масел в составе кормовой добавки, обладает антимикробной активностью, антиоксидантным действием и противовоспалительным эффектом. Этот препарат подавляет развитие патогенной микрофлоры в желудочно-кишечном тракте птицы, благоприятствует нормализации процессов пищеварения, повышению перевариваемости и усвояемости питательных веществ рациона, способствует повышению продуктивности и восстановлению здоровья у животных. Использование препарата Интебио позволяет снизить или даже полностью исключить использование антибиотиков. Эфирные масла, входящие в состав препарата, препятствуют возникновению респираторных заболеваний, уменьшают падеж птицы [5].

Однако вопрос о том, чем опосредовано действие фитобиотика Интебио на молекулярном уровне, до сих пор остается неизвестным. Чтобы пролить свет на решение этой проблемы, нами было предпринято исследование с целью выяснить, как влияет введение препарата Интебио в рацион кур-несушек на экспрессию некоторых генов, связанных с продуктивностью и иммунитетом кур [8–10]. Оценку экспрессии генов *PENK*, *AvBD9*, *AvBD11*, *OVAL*, *OCX-32 (RARRES1)* и *OCX-36 (BPIFB3)* у птиц при скормливании им фитобиотика Интебио на фоне заражения птицы бактериями рода *Salmonella* проводили в период с 25.05.2018 г. по 14.2.2019 г. [4]. Пробы для анализа экспрессии генов отбирали у птиц, разделенных на пять групп: птица без скормливания препаратов и без заражения (контроль 1), скормливание птице антибиотика Вирджи-ниамицина (контроль 2) без заражения, птица без заражения, получавшая фитобиотик Интебио (опытная группа 1), зараженная птица, полу-

чавшая антибиотик Вирджиниамицин (опытная группа 2), и зараженная птица, получавшая антибиотик и фитобиотик (опытная группа 3). Отбор проб проводили через 7 суток после заражения. Анализ экспрессии генов интереса проводили при помощи метода ПЦР в реальном времени.

В результате было показано, что в тканях слепых отростков наибольшая экспрессия гена *PENK* наблюдалась при скармливании курам препаратов и заражении сальмонеллой, но в тоже время при скармливании только фитобиотика она тоже была повышена по сравнению с контролем, а скармливание только антибиотика Вирджиниамицин угнетало экспрессию этого гена. В отличие от этого, скармливание курам фитобиотика приводило к снижению экспрессии гена *AvBD9* в тканях слепых отростков по сравнению с контролем. При этом экспрессия гена *AvBD11* при скармливании курам фитобиотика, наоборот, повышалась по сравнению с контролем. Гены *AvBD9* и *AvBD11* относятся к большому семейству генов, кодирующих эндогенные антимикробные пептиды — β -дефензины. Они играют ключевую роль в обеспечении первой линии защиты организма от инфекции и способны обезвреживать широкий спектр патогенов, включающий разнообразные бактерии, грибы, а также оболочечные вирусы. Интересно отметить, что в наших исследованиях препарат Интебио оказал разнонаправленное действие на экспрессию этих двух генов.

Ген *OVAL* кодирует овальбумин яичного белка. Синтез овальбумина влияет как непосредственно на массу яйца, так и на время прохождения фолликула по яйцеводу, то есть опосредованно на количество сносимых яиц за единицу времени. В слепых отростках экспрессия гена овальбумина при скармливании фитобиотика была в 2–3 раза выше, чем в контроле.

OSX-32 является белком матрикса, содержащимся в наружных слоях яичной скорлупы и в надскорлупной пленке. Ген *OSX-32* локализуется на куриной хромосоме 9q и состоит из шести экзонов. Многочисленные сообщения в литературе указывают на связь между вариантами гена *OSX-32*, кодирующего этот белок, и различным качеством яичной скорлупы. Исследования показали значительное влияние гена *OSX-32* на ассоциацию признаков: цвет скорлупы, высоту белка в яйце, вес яйца и вес желтка. *OSX-32*, являясь белком матрицы яичной скорлупы, участвует в формировании антимикробных свойств яичной скорлупы, обеспечивая защиту для развивающихся эмбрионов птицы. Скармливание фитобиотика повысило экспрессию гена *OSX-32* в тканях слепых отростков в 7,26 раза по сравнению с контролем и в 8,5 раза после заражения сальмонеллой.

Экспрессия гена *ОСХ-36* в слепых отростках после дачи антибиотика Вирджиниамицин упала ниже уровня контроля на 55%; после заражения экспрессия этого гена снизилась еще до уровня 15% от контроля. В тоже время при скармливании фитобиотика наблюдалась обратная картина: экспрессия повысилась в 2,67 раза, а после заражения — в 179,77 раза.

Таким образом, нами было показано усиливающее действие фитобиотика Интебио на экспрессию генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям у домашней птицы, что на молекулярном уровне объясняет ранее отмеченное положительное действие этого препарата, способствующее повышению продуктивности и восстановлению здоровья у животных. Это исследование послужит основой для дальнейшего более углубленного изучения молекулярных мишеней для различных ветеринарных препаратов.

Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Багно О.А., Прохоров О.Н., Шевченко С.А., Шевченко А.И., Дядичкина Т.В. Фитобиотики в кормлении сельскохозяйственных животных (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. С. 687–697.
2. Дубровин А.В., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Йылдырым Е.А., Кочиш И.И., Новикова О.Б. Влияние кормовой добавки на основе эфирных масел на здоровье и продуктивность цыплят кур // Ветеринария. 2018. № 12. С. 12–16.
3. Егоров И.А., Ленкова Т.Н., Вертипрахов В.Г., Манукян В.А., Егорова Т.А., Грозина А.А., Свиткин В.С., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Никонов И.Н. Использование комплексного фитобиотика в комбикормах для молодняка СГЦ «Смена» // Птицеводство. 2017. № 12. С. 15–19.
4. Колесникова Р.Р. Влияние скармливания фитобиотика на экспрессию генов продуктивности и резистентности у кур-несушек // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2019. № 7. С. 49–54.
5. Ланцева Н.Н., Мартыщенко А.Е., Швыдков А.Н., Рябуха Л.А., Смирнов П.Н., Котлярова О.В., Чебаков В.П. Влияние функциональных свойств пробиотиков и фитобиотиков на показатели продуктивности цыплят-бройлеров // Фундаментальные исследования. 2015. № 2–7. С. 1417–1423.

6. Лаптев Г.Ю., Ыылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Новикова Н.И., Тюрина Д.Г., Дубровин А.В., Кочиш И.И., Грозина А.А. Эффективность эфирных масел в птицеводстве. // Сельскохозяйственные вести. 2018. № 4. С. 32–33.

7. Федотов В.А., Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., Егоров И.А., Егорова Т.В. Фитобиотик в кормлении птицы // Птицеводство. 2018. № 8. С. 33–37.

8. Hincke M.T., Nys Y., Gautron J. The role of matrix proteins in eggshell formation // The Journal of Poultry Science. 2010. Vol. 47. No. 3. P. 208–219.

9. Hontatukia M., Tuiskula-Haavisto M., Arango J., Tabell J., Schmutz M., Preisinger R., Vilkki J. QTL mapping of egg albumen quality in egg layers // Genetics Selection Evolution. 2013. Vol. 45. Art. No. 31.

10. Hontatukia M., Tuiskula-Haavisto M., Vilkki J. Chromosome regions affecting body weight in egg layers // Agricultural and Food Science. 2007. Vol. 16. No. 2. P. 177–187.

Influence of the phytobiotic Intebio on the expression of productivity and immunity genes in laying hens

Kochish I.I.,¹ Myasnikova O.V.,¹ Martynov V.V.²

¹ K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

² Moscow State Regional University, Mytishchi, Moscow Oblast, Russia.

Abstract

The article presents studies on evaluating the expression of productivity and immunity genes in laying hens, while feeding chickens with the phytobiotic Intebio based on essential oils, and considers its use in the egg industry as an alternative to antibiotics.

Key words: gene expression, productivity of laying hens, phytobiotics, prohibition of antibiotics

Особенности экспрессии генов овокаликсин-36 и овальбумин у высоко- и низкопродуктивных несушек кросса «Ломанн белый ЛСЛ»

Колесникова Р.Р., Кочиш И.И.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Email: rus.kolesnikova@yandex.ru

Аннотация

Задачей нашего исследования было выявить степень экспрессии генов овокаликсина-36 и овальбумина у высоко- и низкопродуктивных кур-несушек, так как эти гены связаны с минерализацией скорлупы и массой яйца. Проведены предварительные исследования на курах-несушках промышленного кросса «Ломанн белый ЛСЛ» на предмет выявления связи между экспрессией генов продуктивности и показателями качества яйца. Достоверные эффекты не получены, и планируется более расширенное изучение взаимосвязи между этими признаками.

Ключевые слова: куры-несушки, овокаликсин-36, овальбумин, экспрессия генов

Введение

Состояние и качество скорлупы характеризуются ее цельностью, чистотой и прочностью, упругой деформации и другими показателями. Эти показатели зависят от генетических особенностей породы птицы, методов ее содержания и состава рациона. Прочная и чистая скорлупа обеспечивает более длительное сохранение высокого качества яиц, улучшает товарный вид, снижает количество боя.

В птицеводческой отрасли бой и трещины скорлупы яйца у промышленной несушки обуславливают значительные экономические потери [3]. Тонкая скорлупа увеличивает риск появления трещин, что, в свою очередь, приводит к бактериальному загрязнению яиц [6]. Полноценное развитие птичьего эмбриона напрямую зависит от крепкой скорлупы, обеспечивающей механическую и антибактериальную за-

щиту яйца, предотвращает от избыточной потери влаги и служит первоначальным источником кальция для развития скелета эмбриона цыпленка [4]. Таким образом, качество скорлупы яйца является важным критерием в разведении сельскохозяйственной птицы. Важнейшими экономическими показателями в птицеводстве также являются яйценоскость и масса яйца у кур-несушек.

Для данного исследования были взяты гены, участвующие в формировании признаков продуктивности, отвечающие за минерализацию скорлупы и массы яйца и имеющие следующие характеристики:

- Овокаликсин-36 (ОСХ-36) был идентифицирован относительно недавно как новый специфический белок яичной скорлупы, который играет ключевую роль в минерализации яичной скорлупы, высоко секретируется в маточных железистых клетках во время активной фазы кальцификации и содержится в яичной скорлупе и желточной мембране [1]. Выявлен только в тех регионах яйцевода, где происходит формирование скорлупы и включен в оболочки мембран, преимущественно во внутренней части кальцинированной яичной скорлупы [2]. Является матричным белком, который содержится во внешних слоях яичной скорлупы и в надскорлупной оболочке.

- Овальбумин (OVAL) является основным протеином яичного белка, синтезируется в яйцеводе курицы [7] и потребляется развивающимися эмбрионами птиц в качестве дополнительного к желтку источника питания. Две разновидности протеина овальбумина, известные как овальбумин X и овальбумин Y, также сосредоточены в яичном белке [5].

Целью нашего исследования являлось изучение различий в степени экспрессии генов *ОСХ-36 (BP1FB3)* и *OVAL* у высоко- и низкопродуктивных кур для возможного прогнозирования.

Материалы и методы

Для исследования использовали поголовье кур кросса «Ломанн белый ЛСЛ». Молодок в возрасте 15 недель посадили в индивидуальные клетки. Это позволило проводить индивидуальную оценку по всем показателям. Кормление и параметры микроклимата соответствовали рекомендациям поставщика кросса. В 18 недель начали световую стимуляцию. Учитывали возраст снесения первого яйца по каждой курице индивидуально. Всю опытную птицу разделили по яйценоскости на две группы — с низкой и высокой продуктивностью.

Перед убоем было выполнено морфологическое исследование яиц по ряду показателей качества яиц, приведенных в табл. 1.

Таблица 1. Результаты морфологического исследования яиц

Параметры	Масса яйца, г	Индекс формы, %	Упругая деформация, мкм	% скорлупы	% желтка	Толщина скорлупы, мм	% белка
Высокопродуктивные (N=12)							
<i>X</i>	54,40	75,94	18,75	11,32	24,05	0,42	64,63
Стандартное отклонение	2,56	3,40	2,38	4,61	1,61	0,03	4,46
<i>Sv</i> , %	4,70	4,47	12,67	40,72	6,68	7,81	6,91
Ошибка	0,35	0,39	0,55	1,37	0,33	0,05	0,56
Низкопродуктивные (N=12)							
<i>X</i>	52,73	78,06	18,94	12,53	23,08	0,39	64,39
Стандартное отклонение	4,95	2,43	3,17	0,72	0,41	0,02	0,79
<i>Sv</i> , %	9,38	3,11	16,72	5,73	1,76	4,88	1,23
Ошибка	0,68	0,27	0,73	0,20	0,08	0,03	0,10

В возрасте 25 недель провели убой по 4 головы из каждой группы для отбора тканей матки и воронки яйцевода. Оценили экспрессию генов, влияющих на минерализацию скорлупы и на массу яйца. За 100% экспрессии взяли низкопродуктивную группу птицы. За эталон был взят ген домашнего хозяйства — TATA-связывающего белка (ТВР). Расчет относительной генной экспрессии был произведен при помощи метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001)

Результаты и обсуждение

Как показало морфологическое исследование яиц (табл. 1), изученные морфологические показатели между высоко- и низкопродуктивными курами не имели достоверных различий, однако заметны тенденции более высокого выхода белка у высокопродуктивных кур и скорлупы у низкопродуктивных кур, что требует дальнейшего изучения.

Проводили предварительную оценку экспрессии генов *OSX-36* и *OVAL*; результаты анализа представлены в табл. 2. Исследование экспрессии двух генов показало, что достоверной разницы между высоко- и низкопродуктивной птицей нет, что, видимо, требует более детального изучения на большем поголовье и в различные периоды яйцекладки.

Таблица 2. Оценка степени экспрессии генов *OSX-36* и *OVAL*

Ткань	Ген	Группа кур	Ct <i>TBP</i>	Ct	ΔCt (Ct— Ct <i>TBP</i>)	$\Delta\Delta Ct$ (ΔCt 2— ΔCt 1)	Нормализованные значения к группе 1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Матка	<i>OVAL</i>	Низко-продуктивные (1)	26,50	25,79	-0,71	0	1
		Высоко-продуктивные (2)	24,82	25,59	0,77	1,48	0,36
	<i>OSX-36</i>	Низко-продуктивные (1)	26,50	22,18	-4,32	0	1
		Высоко-продуктивные (2)	24,82	22,38	-2,44	1,88	0,27
Воронка яйцевода	<i>OVAL</i>	Низко-продуктивные (1)	30,21	31,53	1,32	0	1
		Высоко-продуктивные (2)	25,57	33,56	7,99	6,66	0,01
	<i>OSX-36</i>	Низко-продуктивные (1)	30,21	33,98	3,77	0	1
		Высоко-продуктивные (2)	25,57	34,03	8,46	5,86	0,04

Планируется провести дополнительное изучение, на основании чего можно было бы более достоверно предположить, как изучаемые гены связаны с яичной продуктивностью, формированием скорлупы, кальциевым обменом, показателями яичной массы и другими показателями морфологии яйца.

Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочиш И.И., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Смоленский В.И., Сурай П.Ф. Кормовые и ветеринарные аспекты состояния микробиоты кишечника кур-несушек. М.: Сельскохозяйственные технологии, 2017. С.10–12.
2. Gautron J., Murayama E., Vignal A., Morisson M., McKee M.D., Réhault S., Labas V., Belghazi M., Vidal M.L., Nys Y., Hincke M.T. Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and

Plunc family proteins // *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282. No. 8. P. 5273–5286.

3. Hamilton R., Hollands K., Voisey P., Grunder A. Relationship between egg shell quality and shell breakage and factors that affect shell breakage in the field—a review // *World's Poultry Science Journal*. 1979. Vol. 35. No. 3. P. 177–190.

4. Karlsson O., Lilja C. Eggshell structure, mode of development and growth rate in birds // *Zoology (Jena)*. 2008. Vol. 111. No. 6. P. 494–502.

5. Mann K., Mann M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes // *Proteomics*. 2008. Vol. 8. No. 1. P. 178–191.

6. Messens W., Grijspeerdt K., De Reu K., De Ketelaere B., Mertens K., Bamelis F., Kemps B., De Baerdemaeker J., Decuypere E., Herman L. Egg-shell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* // *Journal of Food Protection*. 2007. Vol. 70. No. 3. P. 623–628.

7. Palmiter R.D., Mulvihill E.R., Shepherd J.H., McKnight G.S. Steroid hormone regulation of ovalbumin and conalbumin gene transcription. A model based upon multiple regulatory sites and intermediary proteins // *The Journal of Biological Chemistry*. 1981. Vol. 256. No. 15. P. 7910–7916.

Expression features of ovocalyxin-36 and ovalbumin genes in high- and low-productive laying hens of the Lohmann White LSL cross

Kolesnikova R.R., Kochish I.I.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

The objective of our study was to explore the degree of expression of the ovocalyxin-36 and ovalbumin genes in high- and low-productive laying hens, since these genes are associated with shell mineralization and egg mass. Preliminary studies have been carried out on laying hens of the Lohmann White LSL industrial cross to identify the relationship between the expression of productivity genes and egg quality characters. No significant effects were obtained so far, and a more expanded study of the relationship between these traits is planned.

Key words: laying hens, ovocalyxin-36, ovalbumin, gene expression

УДК 636.5.087.8

Оценка экспрессии генов, формирующих яйценоскость, у кур-несушек с различными сроками наступления половой зрелости

Берникова К.Е., Куванов Т.К., Мясникова О.В.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Email: amarilz@mail.ru

Аннотация

В данной статье представлены результаты предварительных исследований по оценке экспрессии генов пролактина (*PRL*) и рецептора гонадотропин-рилизинг-гормона (*GNRHR*), формирующих яйценоскость у кур-несушек кросса «Ломанн белый ЛСЛ», с различными сроками наступления половой зрелости.

Ключевые слова: экспрессия генов, куры-несушки, пролактин, рецептор гонадотропин-рилизинг-гормона, яйценоскость, половая зрелость

Введение

В яичном птицеводстве показателями экономической эффективности производства являются раннее начало яйцекладки, ее стабильность и быстрое увеличение массы яйца до товарного качества. Это позволяет производителям начать получать возврат вложенных средств как можно раньше, что обеспечивает более высокую рентабельность производства. Поэтому отбор кур селекционного стада на раннюю и стабильную яйценоскость является актуальным. Яйценоскость и качество яиц — это признаки, которые характеризуются полигенным характером наследования, когда одни гены отвечают за формирование качественной скорлупы, другие — за качество белка и массу яйца и т. д. Известны случаи, когда селекционерами были созданы линии, несущие яйцо с повышенным содержанием сухого вещества и с другими улучшенными морфологическими показателями [11].

Выработки фолликулов и процесс яйцекладки в целом контролируются и обеспечиваются сложной нейрогуморальной системой. Эта система состоит из отделов головного мозга (включая аденогипофиз) и яичника.

Начало всего цикла, в ходе которого формируется фолликул и происходит его последующая овуляция, находится в гипоталамусе — очень маленьком, глубокорасположенном участке головного мозга. Гипоталамус вырабатывает гонадотропин-рилизинг-гормон (GnRH), который и дает сигнал к производству остальных гормонов, обеспечивающих формирование яйцекладки, то есть лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов. В частности, гонадотропин-рилизинг-гормон стимулирует гипофиз к секреции гонадотропинов, которые вызывают синтез стероидов в гонаде, регулируя рост яичников и овуляцию у кур. Некоторые исследования указывают на то, что гипоталамус должен созреть для того, чтобы реагировать на световую стимуляцию, и тогда птица сможет начать яйцекладку. Однако факторы, которые определяют срок, когда несушка достигнет половой зрелости, остаются не полностью изученными.

Измерение уровня гонадотропин-рилизинг-гормона в крови при помощи радиоиммунологического способа — очень сложный, затратный и неточный метод, поэтому опосредованная оценка через экспрессию гена рецептора этого гормона (*GNRHR*) может стать хорошей альтернативой. Ген *GNRHR* локализуется на 10-й хромосоме и имеет 4 экзона [1]. Ранее проводился поиск SNP-маркеров в этом гене, которые могли бы быть ассоциированы с теми или иными хозяйственно полезными признаками у кур [6–10, 16].

Гормон пролактин (PRL), являясь пептидным гормоном, оказывает серьезное влияние на обменные процессы в организме млекопитающих и птиц благодаря своей ростовой, анаболической, гипергликемической и лактогенной активности. Этот гормон также оказывает влияние на функционирование яичников, в частности, на формирование желтых тел и рост фолликулов. У птиц пролактин выступает в качестве гормона, который влияет на показатели яйценоскости [1, 19, 21]. Известно, что он отвечает за инстинкт насиживания у кур [1, 13, 19]. Этот инстинкт плохо влияет на показатели яйценоскости, которые принято считать главными при производстве пищевых яиц [1].

Ген пролактина (PRL) локализуется на 2-й хромосоме, содержит 5 экзонов и 4 интрона при общей длине ~6,14 т. п. н. [1, 2]. Ряд авторов рекомендуют использовать ген PRL как маркер продуктивных показателей кур. Однако для оценки возможных ассоциаций PRL с продуктивными признаками применяют *indel*-полиморфизм в промоторной части гена [2, 3, 5]. В других исследованиях были выявлены 13 SNP-маркеров (однонуклеотидных полиморфизмов) и два индела в промоторной части гена, однако их ассоциация с продуктивностью и инстинктом насиживания не была окончательно установлена [4].

Разработка более простой и достоверной системы оценки и прогнозирования продуктивности у несушек при помощи молекулярно-генетических методов представляется актуальной как для современной науки, так и для селекционных программ в птицеводстве. В связи с этим целью текущего исследования является оценка экспрессии генов тех гормонов, которые играют важную роль в формировании фолликулов, включая гены PRL и GNRHR.

Материалы и методы

Для настоящего исследования было отобрано поголовье 15-недельных молодок финального гибрида кросса «Ломанн белый ЛСЛ» с Окской птицефабрики Рязанской области в количестве 134 головы. Для этого была осуществлена длительная, 5-часовая перевозка кур автотранспортом на расстояние 185 км. Затем проводили посадку кур в виварии в индивидуальные клетки. После посадки еженедельно учитывали индивидуальную динамику живой массы. Кормление и параметры микроклимата соответствовали рекомендациям поставщика кросса. В возрасте 18 недель начали световую стимуляцию птицы согласно рекомендациям кросса. Далее продолжили учет живой массы, а также учитывали возраст снесения первого яйца по каждой несушке, проводили учет признаков морфологии яиц и осуществляли забор крови из крыла на 25-й и 29-й неделях.

На основе показателей половой зрелости куры были разделены на две группы — с ранней и поздней половой зрелостью (*табл. 1*).

Таблица 1. Показатели половой зрелости опытной птицы

Куры-несушки	N (голов)	Возраст снесения первого яйца (дней)	CV (%)
Вся птица	134	150,70±0,70	5,4
Раннеспелые	67	143,90±0,53***	3,0
Позднеспелые	67	157,50±0,56***	2,9

Примечания: CV — коэффициент вариации. *** Разница в возрасте снесения первого яйца между двумя группами достоверна ($p < 0,001$)

Для продолжающегося в настоящее время изучения профилей генной экспрессии в тканях воронки яйцевода и матки нами были отобраны гены *GNRHR* и *PRL*, контролирующие синтез соответствующих гормонов, которые принято считать функциональными кандидатами:

- участвующими в формировании признаков яичной продуктивности кур-несушек при достижении ими возраста наступления половой зрелости, включая рост фолликулов,

- стимулирующими овуляцию,
- обеспечивающими яйцекладку и т. д.

Для контрольного убоя в возрасте 25 недель (180 дней) было отобрано по 4 головы из каждой группы (табл. 2), у которых были взяты ткани органов матки и воронки яйцевода для оценки экспрессии генов *GNRHR* и *PRL*.

Таблица 2. Показатели половой зрелости отобранных кур для исследования

№ курицы	Раннеспелые		Позднеспелые	
	Возраст снесения первого яйца (дней)	Живая масса (г)	Возраст снесения первого яйца (дней)	Живая масса (г)
1	138	1142	151	1176
2	140	1198	151	1090
3	144	1140	157	1072
4	148	1152	168	1130
X среднее	142,50±2,22*	1158	156,75±4,01*	1117

* Разница в возрасте снесения первого яйца между двумя группами достоверна ($p < 0,05$)

Показатели продуктивности и уровень экспрессии у кур из группы с ранней половой зрелостью брали в качестве эталона, равного 1, с которым сравнивали позднеспелых кур. Для внутреннего контроля был взят ген домашнего хозяйства — ТАТА-связывающего белка (*TBP*). Расчет относительной экспрессии генов был произведен при помощи метода [12].

Результаты и обсуждение

В табл. 3 и 4 представлены предварительные результаты не завершеного на данный момент анализа экспрессии гена *GNRHR* у раннеспелых и позднеспелых кур.

Таблица 3. Расчет степени экспрессии гена *GNRHR* в матке кур по методу сравнительной нормализации позднеспелой группы (2) к раннеспелой (1)

Группа кур	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>GNRHR</i>	$\Delta Ct (Ct \text{ } GNRHR - Ct \text{ } TBP)$	$\Delta \Delta Ct (\Delta Ct \text{ } 2 - \Delta Ct \text{ } 1)$	Нормализованные значения к группе 1 ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Раннеспелые (1)	24,47	22,84	-1,63	-	1
	28,19	21,21	-6,98		
	22,96	25,95	2,99		
	24,35	25,61	1,26		
X среднее	24,99	23,90	-1,09		
Позднеспелые (2)	23,47	24,30	0,83	-0,76	1,69
	24,64	24,37	-0,27		
	25,52	23,09	-2,43		
	30,6	25,08	-5,52		
X среднее	26,05	24,21	-1,85		

Таблица 4. Расчет степени экспрессии гена *GNRHR* в воронке яйцевода кур по методу сравнительной нормализации позднеспелой группы (2) к раннеспелой (1)

Группа кур	Ct <i>TBP</i>	Ct <i>GNRHR</i>	ΔCt (Ct <i>GNRHR</i> – Ct <i>TBP</i>)	$\Delta \Delta Ct$ (ΔCt 2 – ΔCt 1)	Нормализованные значения к группе 1 ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)
Ранне-спелые (1)	27,78	26,04	-1,74		
	25,26	21,95	-3,31		
	23,81	22,96	-0,85		
	23,44	23,14	-0,30		
X среднее	25,07	23,52	-1,55	-	1
Позднеспелые (2)	24,84	23,41	-1,43		
	28,86	28,78	-0,08		
	37,11	21,75	-15,36		
	31,74	19,34	-12,40		
X среднее	30,63	23,32	-7,32	-5,77	54,57

Обнаружено, что экспрессия гена *GNRHR* в матке кур с поздней половой зрелостью была выше в 1,69 раза (отличия статистически недостоверны; табл. 3). У кур с поздней половой зрелостью степень экспрессии *GNRHR* в воронке яйцевода была также выше, чем уровень экспрессии этого же гена у кур с ранней половой зрелостью (в 54,57 раза, однако разница статистически недостоверна; табл. 4).

В текущем исследовании уровня экспрессии гена *PRL* большая часть полученных на сегодня результатов показала в целом отсутствие экспрессии. Однако у нескольких кур наблюдалось положительное значение экспрессии гена *PRL*, и это были куры, одновременно показавшие минимальный уровень экспрессии гена *GNRHR*.

Наличие экспрессии пролактина, обнаруженное нами у отдельных особей в органах яйцеобразования — матке и воронке яйцевода, можно увязать с остаточными проявлениями инстинкта насиживания. Поскольку эта птица была отселекционирована по признакам яйценоскости и относится к высокопродуктивному промышленному яичному кроссу, то априори подразумевается, что их исходные формы были подвергнуты жесткому отбору на полное подавление инстинкта насиживания [15, 17–20], и, соответственно, сложно ожидать у этих кур экспрессию данного гена. Предположительно, проявление этого гена у отдельных несушек может говорить о том, что в каких-то случаях можно ожидать исключений при проведении многолетнего селекционного отбора по этому признаку у кур, оцененных в настоящей работе. Учитывая, что уровень активности пролактина — количественный признак, а не качественный,

требуются дальнейшие исследования обнаруженного эффекта. Поэтому продолжение изучения экспрессии пролактина у кур может быть интересным и перспективным, с тем чтобы выявить истинную природу или причину наблюдаемого явления. В перспективе планируется изучение экспрессии и других генов.

Мы полагаем, что одной из причин большого разброса птицы по возрасту снесения первого яйца являлись такие стресс-факторы, как длительная транспортировка и посадка, которая отличалась от группового содержания при выращивании молодки на птицефабрике. Птица с поздним началом яйцекладки — это птица с низкой адаптационной способностью, ведь известно, что при стресс-факторах птица поздно начинает нестись.

Предполагается, что достижение несущей определенной живой массы является показателем начала яйцекладки. Имеются также сообщения, что птица с недоразвитой мышечной системой будет запаздывать с наступлением половой зрелости [14]. Однако в наших исследованиях корреляция между живой массой и возрастом снесения первого яйца оказалась небольшой ($r=-0,2$), что указывает на очень низкую взаимосвязь этих показателей.

Заключение

Задачами проводимого исследования являются установление генов, которые могут быть индикаторами яичной продуктивности у кур с различной стрессоустойчивостью, и оценка степени экспрессии этих генов при разных уровнях наступления половой зрелости. У кур, которые занесли позже, может иметь место пониженная устойчивость к стрессу. Исходя из полученных неполных данных, можно предположить, что из-за стресс-факторов при одинаковом генотипе куры показали разное начало яйцекладки. У раннеспелых кур отмечалась тенденция снижения степени экспрессии гонадотропин-рилизинг-гормона по сравнению с позднеспелыми. У отдельных особей обнаружена экспрессия гена пролактина.

Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Крутикова А.А. Полиморфизм генов миостатина *MSTN*, пролактина *PRL* и рецептора D2 дофамина *DRD2* у кур разного направления продуктивности: дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук (03.02.07). СПб., 2017. 124 с.

2. Кулибаба Р.А. Полиморфизм генов гормона роста, рецептора гормона роста, пролактина и рецептора пролактина в связи с яичной продуктивностью у кур породы полтавская глинистая // *Сельскохозяйственная биология*. 2015. Т. 50. № 2. С. 198–207.

3. Митрофанова О.В., Дементьева Н.В., Крутикова А.А. Полиморфизм в промоторе гена пролактина и его ассоциация с направлением продуктивности у кур // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]*. Краснодар: КубГАУ, 2015. № 07 (111). С. 1510–1519. IDA [article ID]: 1111507098.

4. Cui J.X., Du H.L., Zhang X.Q. [Polymorphisms and bioinformatics analysis of chicken prolactin gene] // *Yi Chuan*. 2005. Vol. 27. No. 2. P. 208–214.

5. Dementieva N.V., Fedorova E.S., Krutikova A.A., Mitrofanova O.V., Stanishevskaya O.I., Pleshanov N.V., Smaragdov M.G., Kudinov A.A., Terletsy V.P., Romanov M.N. Genetic variability of indels in the prolactin and dopamine receptor D2 genes and their association with economically important traits in Russian White laying hens // *Tarim Bilimleri Dergisi: Journal of Agricultural Sciences*. 2020. Vol. 26. No. 4 (in print).

6. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Wilson P.W., Sharp P.J. The detection and assay of polymorphism in candidate reproductive gene loci in a commercial broiler breeder population for association studies // *Poultry Genetics Symposium*. Mariensee, Germany, 1999. P. 113.

7. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Waddington D., Wilson P.W., Sharp P.J. Association between candidate genes and reproductive traits in a commercial broiler breeder population // *Spring Meeting of the United Kingdom Branch of the World's Poultry Science Association*. York, UK, 2001a. P. 42–43.

8. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Wilson P.W., Waddington D., Sharp P.J. Candidate genes and reproductive traits in a commercial broiler breeder population, an association study // *Journal of Animal Science*. 2001b. Vol. 79. Suppl. 1. P. 43. [*Journal of Dairy Science*, Vol. 84 (Suppl. 1); *Poultry Science*, Vol. 80 (Suppl. 1); *54th Annual Reciprocal Meat Conference (Vol. II)*.]

9. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Waddington D., Wilson P.W., Sharp P.J. Association between candidate genes and reproductive traits in a commercial broiler breeder population // *British Poultry Science*. 2001c. Vol. 42. Suppl. 1. P. S113–S114.

10. Dunn I.C., Miao Y.-W., Morris A., Romanov M.N., Wilson P.W., Waddington D. A study of association between genetic markers in candi-

date genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population // *Heredity*. 2004. Vol. 92. No. 2. P. 128–134.

11. Leghari I.H., Li J., Zeng W., Mi Y., Zhang C. Comparative study of reproductive organs and egg quality characteristics in Hyline and domestic layer breeds // *Pakistan Veterinary Journal*. 2015. Vol. 35. No. 3. P. 315–320.

12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method // *Methods*. 2001. Vol. 25. No. 4. P. 402–408.

13. Reddy I.J., David C.G., Sarma P.V., Singh K. The possible role of prolactin in laying performance and steroid hormone secretion in domestic hen // *General and Comparative Endocrinology*. 2002. Vol. 127. № 3. P. 249–255.

14. Robinson F.E., Renema R.A. Female reproduction: control of ovarian function // *Optimizing chick production in broiler breeder* / F.E. Robinson, G.M. Fasenko, R.A. Renema. Edmonton, Canada: Spotted Cow Press, 2003. Broiler breeder production series. Vol. 1. P. 3–10.

15. Romanov M.N., Talbot R., Wilson P.W., Sharp P.J. Inheritance of broodiness in the domestic fowl // *Spring Meeting of the World's Poultry Science Association (UK Branch)*. Scarborough, UK, 1999a. P. 74–75.

16. Romanov M.N., Miao Y.-W., Wilson P.W., Morris A., Sharp P.J., Dunn I.C. Detection and assay of polymorphism in reproductive gene loci in a commercial broiler breeder population for use in association studies // *Proceedings of the Conference "From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics"*. Ames, IA, USA: Iowa State University, 1999b. P. 155.

17. Romanov M., Talbot R.T., Dunn I.C., Wilson P.W., Sharp P.J. Inheritance of broodiness in the domestic fowl // *Poultry Genetics Symposium*. Mariensee, Germany, 1999c. P. 139.

18. Romanov M.N., Talbot R., Wilson P.W., Sharp P.J. Inheritance of broodiness in the domestic fowl // *British Poultry Science*. 1999d. Vol. 40. Suppl. 1. P. S20–S21.

19. Romanov M.N. Genetics of broodiness in poultry — a review // *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 2001. Vol. 14. No. 11. P. 1647–1654.

20. Romanov M.N., Talbot R., Wilson P.W., Sharp P.J. Genetic control of incubation behavior in the domestic hen // *Poultry Science*. 2002. Vol. 81. No. 7. P. 928–931.

21. Wang C., Liang Z., Yu W., Feng Y., Peng X., Gong Y., Li S. Polymorphism of the prolactin gene and its association with egg production traits in native Chinese ducks // *South African Journal of Animal Science*. 2011. Vol. 41. No. 1. P. 64–69.

Evaluation of the expression of genes that form egg laying in laying hens with different age at first egg

Bernikova K.E., Kuvanov T.K., Myasnikova O.V.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

This article presents the results of studies on evaluating the expression of genes for prolactin (*PRL*) and gonadotropin-releasing hormone receptor (*GNRHR*), which form egg production traits in laying hens of the Lohmann White LSL hybrid with different age at first egg.

Key words: gene expression, laying hens, prolactin, gonadotropin-releasing hormone receptor, egg production, sexual maturity

УДК 636.5.087.8

Методы секвенирования нового поколения и агрогеномика

Буряков Н.П., Щукина С.А., Горст К.А.

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А.Тимирязева», Москва, Россия

E-mail: ksengo87@gmail.com

Аннотация

Развитие методов секвенирования нового поколения СНП обеспечило высокую скорость, автоматизацию, качество и широкий спектр аналитических возможностей геномного анализа, в том числе для решения прикладных задач в аграрном секторе. Основные направления СНП включают геномный анализ, направленное пересеквенирование геномов, секвенирование транскриптома, картирование ДНК-связывающих белков и анализ хроматина. Активное развитие получила агрогеномика, входящая в спектр «омик». Доказана эффективность методологического аппарата агрогеномики для решения прикладных задач по следующим ключевым направлениям аграрного сектора: селекция растений и животных, с.-х. микробиология, анализ состава и плодородия почв, обогащение и восстановление почв; анализ, разработка и производство комбикормов, кормовых добавок и пробиотиков; переработка отходов; ветеринария (диагностика изучение патологий, терапия, усиление иммунитета); производство, оценка и повышение качества пищевых продуктов с.-х. промышленности. Применение анализа СНП в решении прикладных задач агрогеномики позволяет повысить экономическую рентабельность производства.

Ключевые слова: агрогеномика, генетика, геномика, комбикорма, метагеномика, микробиология, нуклеотидная последовательность, омика, продуктивность, с.-х. животные, секвенатор, секвенирование нового поколения СНП, сельское хозяйство, мониторинг качества продуктов питания, рентабельность производства

Введение

Секвенирование нового поколения СНП (англ. *next generation sequencing, NGS*) — техника определения нуклеотидной последователь-

ности ДНК и РНК для получения формального описания ее первичной структуры (рис. 1). Технология методов СНП позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой или многократного лигирования олигонуклеотидов. В ходе СНП могут генерироваться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл [Инге-Вечтомов 2010, Жимулев 2007].

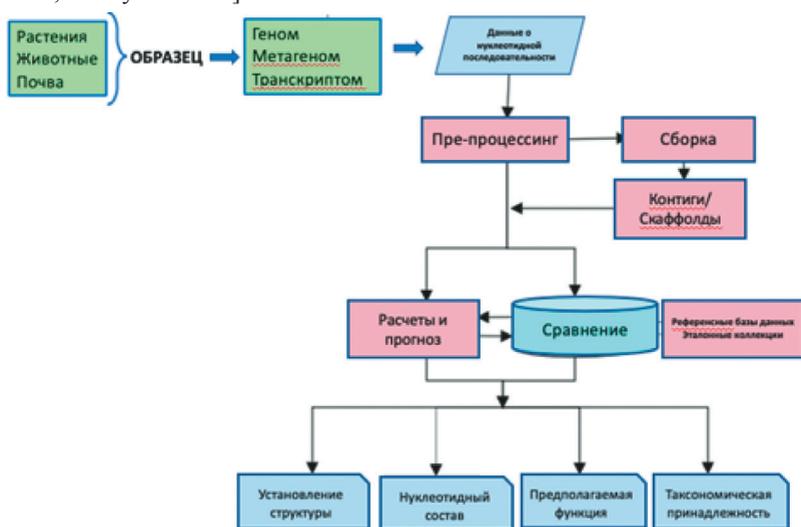


Рис. 1. Общая схема проведения секвенирования нового поколения

СНП продолжает уже известные наработанные методы, но отличается увеличенными качеством, скоростью и информативностью анализа, в том числе за счет ультрасовременного оборудования. Со времени появления в 1977 году первой концепции секвенирования, предложенной Сэнгером в виде «метода обрыва цепи», эта область науки получила значительное развитие и усовершенствование. Переломной точкой развития технологии стало появление полимеразной цепной реакции (ПЦР) и автоматизация основных этапов «чтения» молекулы ДНК, которые дали начало методам СНП [Спирин 2011; Антонов и др., 2003].

Платформы для методов СНП основываются на распараллеливании процесса «чтения» ДНК, и за один прогон работы секвенатора можно определить первичные структуры нескольких участков генома. Стои-

мость секвенаторов нового поколения (порядка \$500 000) и проведения анализов (\$ 2–10 за 1 млн пар оснований) также стала более доступной по сравнению с пилотными проектами, а их эффективность увеличивается: с помощью СНП можно получать от нескольких сотен до нескольких тысяч пар оснований за 1 прочтение и от 1 млн до нескольких миллиардов прочтений за 1 цикл. На сегодняшний день производительность некоторых секвенаторов измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований. Возможно проведение секвенирования полного индивидуального генома в течение всего нескольких дней.

Основы метода СНП

В современных методах СНП применяют ДНК-чипы и интерактивные технологии. Информацию о нуклеотидных последовательностях, собранную в ходе циклических ферментативных реакций ПЦР, визуализируют в виде различных диаграмм, графиков и схем. Полученные данные используются для восстановления нуклеотидной последовательности или, как для технологии SOLiD, динуклеотидных «цветов». Несмотря на разные методы амплификации (получения копии) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтенных последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов включает три стадии:

1. Создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые можно будет сшить с общедоступными адаптерными последовательностями.
2. Создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут использованы как образцы.
3. Определение первичной структуры всех фрагментов.

К преимуществам современных методов СНП относится высокая точность и производительность; увеличенная степень детализации результатов анализа; возможность проведения как качественного, так и количественного анализа; «сквозная» применимость во всем аграрном секторе, «от зерна до прилавка»; приемлемая стоимость проведения анализа.

При помощи меченых зондов — клонированных копий отдельных генов — возможен анализ непосредственно вариантов самих генов и сравнение электрофоретической подвижности фрагментов геномной ДНК. Молекулу ДНК расщепляют той или иной рестриктазой и выявляют конкретные гены и их фрагменты по гибридизации с мечеными зондами — клонированными фрагментами ДНК. В таком анализе возможно учитывать гетерогенность популяции по длине рестрикционных

фрагментов (RFLP — restriction fragments length polymorphism) и даже выявлять замены отдельных нуклеотидов.

Наиболее часто определяемые маркеры генетических детерминант на сегодняшний день — это полиморфизмы отдельных нуклеотидов (SNP — single nucleotide polymorphism; не путать с СНП — секвенированием нового поколения). При помощи анализа полиморфизма SNP осуществляют полногеномный анализ, генетический анализ различных патологий и заболеваний. Полиморфизм SNP применяют при проведении генетического анализа в таксономическом определении (уточнение видов живых организмов и таксономической принадлежности), а также в генетике популяций. С развитием методов секвенирования стало возможным выявление SNP в составе изучаемых геномов и создание специальных SNP-чипов для направленного исследования генома на наличие определенных заданных SNP, которые соответствуют желательному фенотипу.

В направленной генетической селекции включение результатов анализа полиморфизма SNP в расчеты позволяет повысить предсказательную ценность метода до 40% [Perez-Enciso 2015, Blasco 2014]. Такие методы могут быть применимы, например, при введении репродуктивных технологий на базе направленного генетического отбора в животноводстве [Thomasen 2016 и др].

Таким образом, наиболее современные методы СНП делают возможной работу с геномом живых организмов — растений, животных и бактерий на принципиально новом уровне [Сао 2017, Perez-Enciso 2015]. При помощи СНП стало возможным проведение широкоформатного анализа последовательностей генома большого числа видов, в том числе немодельных организмов; изучение организации, структуры, функционирования и эволюции генома с высокой степенью детализации и большой аналитической и предсказательной ценностью.

СНП также открывает возможности для изучения генетических механизмов в основе биологических процессов и функций живого организма и влияния среды на них [Sharma 2017, Thomasen 2016, Van Borm 2015].

Среди ценных для практической зоотехнии областей прикладного применения данных анализа СНП — увеличение продуктивности животных и качества получаемой продукции (мясо, молоко, яйцо) и повышение выживаемости и устойчивости к патогенам среди поголовья (КРС, овцы, птица и др. с.-х. животные) при сокращении экономических затрат на производстве. В анализе СНП возможно получение широких панелей (большого объема) геномной информации, связанной с функциональными изменениями. Разработан международный стандарт для метода СНП — ISO/IEC 17025:2017.

С появлением СНП получил развитие целый спектр «омик» (Omics) — наук о геноме, включая протеомику, транскриптомику, эпигеномику, метаболомику, агрогеномику и др. (см. схему на рис. 2), которые вносят значительный вклад в изучение устройства и функций биологических систем (отдельных организмов и сообществ), в том числе для изучения на молекулярном уровне изменений, происходящих в процессе развития, при изменении состояний системы (физиологических, молекулярных и биохимических в норме и при патологии) и под воздействием изменяющихся факторов окружающей среды [OMICS..., 2013]. Образцы для анализа могут быть взяты от одной особи, от нескольких особей одного вида (популяции) или разных видов (сообщества — ценоза) [Knief 2014, Wang 2013, Van Emon 2015].



Рис. 2. Комплекс «омик» — современных наук по изучению биологических объектов на основании данных об их генах и геномах (omics-based studies)

Описание молекулярного компонента в популяционной генетике видов необходимо для понимания эволюционных процессов, влияющих на генетическую изменчивость вида. Кроме того, такие исследования вносят существенный вклад в количественный анализ признаков, в частности, за счет идентификации новых и доминантных аллелей и/или для оценки вклада изменчивости генотипа в паттерны экспрессии генов и изменчивости фенотипа под влиянием факторов окружающей среды [Seman 2010, Ekblom 2014].

Компьютерная обработка данных СНП-анализа

В связи со сложностью и многофакторностью СНП, а также его значительной информационно-технологической компонентой для успеш-

ной работы с методом необходимы не только компетентные знания в соответствующих областях биологии (генетики, микробиологии, почвоведении, животноводства), но и экспертные навыки в области компьютерных технологий. Большое значение для успешного проведения и интерпретации данных СНП — в разработке и применении современных методов и инструментов для компьютерной, в том числе статистической обработки полученных экспериментальных данных. Необходимость прочтения, обработки, систематизации, интерпретации и хранения огромного количества информации о последовательностях ДНК и РНК как в рамках конкретных проектов, так и в форматах единых баз данных обуславливает потребность в конструировании специального программного обеспечения и платформ для СНП.

В этой связи, помимо уже существующих статистических программ и баз данных нуклеотидных последовательностей (таких, как GenBank, NCBI), создан новейший проект BioCompute Object (BCO). Начало проекта стало возможным благодаря объединенной работе Университета им. Джорджа Вашингтона (George Washington University) и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA, USFDA). Для проекта уже разработан и утвержден международный стандарт, проект активно развивается [Ginsburg 2009; Пальцев 2011; Simonyan et al., 2017; BCO STU, 2017].

Аграрная геномика (агрогеномика)

Аграрная геномика (агрогеномика) — одно из направлений науки геномики в сфере сельского хозяйства и почвоведения. Агрогеномика изучает геномы с.-х. растений и животных, а также биоценозов почв и вод, применяется в разработке инновационных решений для сельского хозяйства и пищевой промышленности [van der Vlugt 2015, Van Borm 2015, Deusch 2015]. Данные картирования геномов имеют практическую значимость для ведения работы в популяционной генетике и селекции с.-х. животных и растений, в том числе для совершенствования кроссов и пород, для направленной селекции по выбранным признакам/качествам фенотипа, для ветеринарии — при разработке вакцин, для лечения и профилактики заболеваний и оптимизации плановых ветеринарно-санитарных мероприятий.

В ходе СНП-анализа выделяют фрагменты генома (участки хромосом и отдельные гены), которые вносят наибольший вклад в ответ организма на изменения условий среды, и данные таких анализов помогают описать механизмы этих изменений на молекулярном и клеточном уровне,

например, в ответ на изменение состава и/или калорийности комбикорма, введение вакцин, кормовых добавок или антибиотиков [Bai et al., 2012]. Особый интерес для изучения представляют взаимодействия ген-ген и ген-среда [Kadarmedeen 2014]. Содержание геномных последовательностей доступно в открытых базах данных (BigData), которые регулярно пополняются новыми данными о последовательностях геномов и результатами анализа SNP, многие из них — международные.

Значительное место в рамках агрогеномики занимает изучение геномов прокариот — микроорганизмов, обитающих в почвах, воде, растениях и в кишечнике животных. Микроорганизмы — неотъемлемая часть всех биоценозов: воды, почвы, живых организмов (растений, животных и человека), и показатели их качественного и количественного состава во многих случаях являются характеристическими признаками биоценоза — его состояния и изменений, происходящих в нем. Анализ микробиомов позволяет описывать и сравнивать их, а также выявлять происходящие изменения во времени и под воздействием различных факторов — средовых, физических и технологических условий содержания животных, зоотехнических (вакцинации, состава рационов, кормовых добавок) и др.

Сравнительно небольшая относительно огромного биоразнообразия степень изученности геномики в сочетании с важной ролью микроорганизмов в агро- и биоценозах делает данные исследования актуальными как для фундаментальной науки, так и для практики в сфере сельского хозяйства. Плодородие почв, урожайность с.-х. культур и их защита от вредителей, продуктивность и здоровье с.-х. животных и качество производимой с.-х. продукции тесно связаны с популяционно-видовым составом микробиологического сообщества и часто обусловлены изменениями, происходящими в нем. Современные методы СНП позволяют изучать биоразнообразие микроорганизмов, выявлять взаимосвязи в биоценозах и механизмы/этиологию происходящих изменений [Whitman 1998, Rappe 2003, Acosta-Martínez et al., 2014]. На основе получаемых результатов создают практические и прикладные решения для сельского хозяйства с целью увеличения качества и продуктивности производства, повышения безопасности и защиты от патогенов почв, растений и животных.

Важно также и то, что при успешном применении таких разработок снижаются производственные материальные затраты, а его производительность и экономическая рентабельность возрастает. Таким образом, успехи агрогеномики оказывают положительное влияние на экономику отрасли, что является безусловным стимулирующим фактором для развития этой научной области.

Мониторинг качества продуктов питания

Применение СНП позволяет с высокой степенью точности и детализации оценивать видовой состав бактериального микробиома пищевых продуктов и его изменения в процессе хранения и при применении различных методов обработки продукции (охлаждения, замораживания, маринования, добавления соли и других агентов для увеличения срока хранения и сохранности пищевой продукции).

При помощи СНП становится возможным сравнительный анализ (качественной и количественный), а также оценка исходных и приобретенных свойств продукта и корреляции с составом микробиома. Так, например, уже известно, что при добавлении соли и применении вакуумной упаковки сохранение свежести, защита от протухания и увеличение сроков хранения мясной гастрономии на уровне микробиома обеспечивается за счет видов *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* и *Leuconostocaceae*. Такое подробное изучение микробиома стало возможным именно с применением методов СНП [Fougy 2016]. В исследованиях было показано, что быстрое протухание пищевых продуктов, а также потеря ценных гастрономических свойств (приятного вида, цвета, запаха консистенция и вкусовых качеств) связаны именно с изменениями в составе и численности микробиома, как правило, с дефицитом либо полной элиминацией из состава микробиома ряда видов бактерий [Gschwendtner 2016]. Подобные исследования на данный момент проведены уже для достаточно большого числа видов продукции, в том числе для мясомолочных продуктов [Nieminen 2012, Lo 2016], подтверждена достоверность и статистическая значимость результатов.

ЛИТЕРАТУРА

Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И., Вознесенский С.А., Козлова Е.К. Биофизика: учеб. для студентов вузов / Под ред. В.Ф. Антонова. 2-е изд., испр. и доп. М.: Владос, 2003. 288 с.

Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Изд. 4-е. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. 479 с.

Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Изд. 2-е, перераб. и доп. СПб.: Н-Л, 2010. 720 с.

Пальцев М.А. Персоналифицированная медицина // Наука в России. 2011. № 1. С. 12–17.

Спирин А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка. М.: Академия, 2011. 513 с.

Acosta-Martinez V., Cotton J., Gardner T., Moore-Kucera J., Zak J., Westler D., Cox S. Predominant bacterial and fungal assemblages in agricultural

soils during a record drought/heat wave and linkages to enzyme activities of biogeochemical cycling // *Applied Soil Ecology*. 2014. Vol. 84. P. 69–82.

Bai Y., Sartor M., Cavalcoli J. Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2012. Vol. 3. No. 1. P. 8.

OMICS: Applications in biomedical, agricultural, and environmental sciences / D. Barh, V. Zambare, V. Azevedo (Eds.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 2013. 691 p.

BioCompute Object (BCO) specification document Standard Trial Use (STU) Release 1.0. 2017.

Blasco, A. A short critical history of the application of genomics to animal breeding / A. Blasco, M.A. Toro // *Livestock Science*. August 2014. Vol. 166. P. 4–9.

Cao, Y. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies / Y. Cao // *Frontiers in Microbiology*. September 2017. Vol. 8. Article 1829.

Consortium HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome // *Nature*. 2012. Vol. 486(7402). P. 207–214.

Deusch S., Tilocca B., Camarinha-Silva A., Seifert J. News in livestock research—use of *Omic*s-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015. Vol. 13. P. 55–63.

Eklblom, R. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation / R. Eklblom, J.B.W. Wolf // *Evol. Appl.* 2014. Vol. 7(9). P. 1026–1042.

Epp, L.S. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems / L.S. Epp et al. // *Mol Ecol*. 2012. Vol. 21(8). P. 1821–1833.

Esposito, A. Bioinformatics for agriculture in the Next-Generation sequencing era / A. Esposito et al. // *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016. Vol. 3:9. P. 12. doi 10.1186/s40538-016-0054-8.

Esposito, A. Comparison of rock varnish bacterial communities with surrounding non-varnished rock surfaces: taxon-specific analysis and morphological description / A. Esposito et al. // *Microb. Ecol.* 2015. P. 1–10.

Fougy, L. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity / L. Fougy et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 82. P. 3928–3939. doi: 10.1128/AEM.00323-16.

Ginsburg, G.S. Genomic and personalized medicine: foundations and applications / G.S. Ginsburg, H.F. Willard // *Translational research*. 2009. Vol. 154(6). P. 277–287.

Global SNP In Agrigenomics Market — Analysis & Forecast 2017–2021: Focus on Application (Crops and Livestock), Product Type (Kits and Consumables, Instruments and Others) and Region / March 2018. 201 p. Report ID: 5365480.

Grenier, B. Next-generation sequencing reveals links between nutrition and genes / Dr. B. Grenier // *Biomim.* Dec 2017.

Gschwendtner, S. N₂ gas flushing alleviates the loss of bacterial diversity and inhibits psychrotrophic *Pseudomonas* during the cold storage of bovine raw milk / S. Gschwendtner et al. // *PLoS ONE*. 2016. 11:e146015. doi: 10.1371/journal.pone.0146015.

Handelsman, J. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products / J. Handelsman et al. // *Chem Biol*. 1998. Vol. 5(10). P. 245–249.

Howe, A.C. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes / A.C. Howe // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2014. Vol. 111(13). P. 4904–4909.

ISO/IEC 17025:2017 — General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

ISO/IEC 17025:2017(en) — General requirements for the competence of testing and calibration laboratories — <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v1:en>.

Kadarmedeen, A. Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: Progress, lessons and opportunities / A. Kadarmedeen et al. // *Livestock Science*. 2014 Vol. 166. P. 232–248.

Knief, C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies / C. Knief // *Front Plant Sci*. 2014. № 5.

Kodzius, R. Marine metagenomics as a source for bio-prospecting / R. Kodzius, T. Gojbori T. // *Mar. Genom*. 2015.

Liu, L. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems / L. Liu et al. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hindawi Publishing Corporation. 2012. P. 1–11. doi:10.1155/2012/251364.

Lo, R. Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk / R. Lo, M.S. Turner, M. Weeks, N. Bansal // *Int. J. Food Microbiol*. 2016. Vol. 233. P. 81–89. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.015.

Nieminen, T.T. The effect of marination on lactic acid bacteria communities in raw broiler fillet strips / T.T. Nieminen et al // *Front. Microbiol*. 2012b. Vol. 3. № 376. doi:10.3389/fmicb.2012.00376.

Ofek-Lalzar, M. Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome / M. Ofek-Lalzar // *Nat. Commun*. 2014. № 5.

Pérez-Enciso, M. Sequence- vs. chip-assisted genomic selection: accurate biological information is advised / M. Pérez-Enciso et al. // *Genetics Selection Evolution*. 2015. #47.

Quail, M.A. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers / M.A. Quail // *BMC Genomics*. Jan 2012. Vol. 13 (1). P. 341. doi:10.1186/1471-2164-13-341.

Rappé, M.S. The uncultured microbial majority / M.S. Rappé, S.J. Giovannoni // *Ann Rev Microbiol*. 2003. Vol. 57(1). P. 369–394.

Repkova, J. Application of Next-Generation Sequencing in Plant Breeding / J. Repkova, D. Vlk // *Czech J. Genet. Plant Breed*. 2016. doi: 10.17221/192/2016-CJGPB.

Semagn, K. The genetic dissection of quantitative traits in crops / K. Semagn et al. // *Electron J Biotechnol*. 2010. Vol. 13(5). P. 16–17.

Sharma, A. Next generation sequencing in livestock species — A Review / A. Sharma // *JABG*. 2017 Sep. Vol. 1(1). P. 23–30. <https://doi.org/10.12972/jabng.20170003>.

Simonyan, V. Biocompute Objects—A Step towards Evaluation and Validation of Biomedical Scientific Computations / V. Simonyan, J. Goecks, R. Mazumder // *PDA journal of pharmaceutical science and technology*. 2017. Vol. 71(2). P. 136–146. doi:10.5731/pdajpst.2016.006734.

Thomasen, J.R. Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs / J.R. Thomasen et al. // *Journal of Dairy Science*. 2016. Vol. 99. No. 2.

Van Borm, S. Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? / S. Van Borm et al. // *Veterinary infection biology: molecular diagnostics and high-throughput strategies*. Berlin: Springer. 2015. P. 415–436.

Van der Vlugt, R. Application of next generation sequencing for study and diagnosis of plant viral diseases in agriculture / R. Van der Flugt. 2015.

Van Emon, J. Omics revolution in agricultural research / J. Van Emon // *J. Agri Food Chem*. 2015.

Wang, J. Environmental bio-monitoring with high-throughput sequencing / J. Wang et al. // *Brief Bioinform*. 2013. Vol. 14(5). P. 575–588.

Whitman, W.B. Prokaryotes: the unseen majority / W.B. Whitman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998. Vol. 95(12). P. 6578–6583.

Methods of Next Generation Sequencing and Agrogenomics **Gorst K.A., Shchukina S.A.**

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Abstract

The development of Next Generation Sequencing methods (NGS) has provided high speed, automation, quality and a wide range of analytical capabilities of genomic analysis including those for solving applied problems in the agricultural sector. The main areas of NGS include genomic analysis, directed genome re-sequencing, transcriptome sequencing, mapping of DNA-binding proteins and chromatin analysis. Agrogenomics, included in the Omics spectrum, has been actively developed. The effectiveness of the methodological apparatus of agrogenomics for solving applied problems in the following key areas of the agricultural sector has been proved: plant and animal breeding, agricultural microbiology, analysis of soil composition and fertility, soil enrichment and restoration; analysis, development and production of animal feed, feed additives and probiotics; waste recycling; veterinary medicine (diagnostics, pathology study, therapy, immunity improvement); production, evaluation and improvement of food quality in agricultural industry. The application of the NGS analysis in solving applied problems of agrogenomics can increase the economic profitability of production.

Key words: agrogenomics, genetics, genomics, compound feeds, metagenomics, microbiology, nucleotide sequence, omics, productivity, farm animals, sequencer, next generation sequencing (NGS), agriculture, food product quality testing, profitability

УДК 636:612.019.1(09)

Генетический груз мутаций в породах крупного рогатого скота

Марзанов Н.С.,¹ Девришов Д.А.,² Марзанова С.Н.²

¹ ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Дубровицы, Подольск, Московская обл., Россия;

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: nmarzanov@yandex.ru

Аннотация

Целью работы была оценка пород животных по различным типам мутаций, причины их возникновения и накопления в стадах. Рассматривается определение понятия генетического груза с точки зрения развития современной молекулярной биологии и уровня ведения селекционной работы. Отмечается, что главной причиной накопления различных форм мутаций являются жесткий отбор быков и коров в высокопродуктивных породах, а также интенсивная продажа племенного материала (животных, эмбрионов) из стран с высоким уровнем развития молочного скотоводства. Явление генетического груза требует особого внимания для получения качественной молочной продуктивности со стороны специалистов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, породы, мутации, аллели, генетический груз, иммунодефицит

Введение

Под генетическим грузом понимается термин, чаще всего используемый для обозначения суммы неблагоприятных летальных и сублетальных мутаций в геноме организмов — членов популяции. Концепция была предложена английским популяционным генетиком Haldane (1937).

Генетический груз (genetic load) — накопление летальных и сублетальных отрицательных мутаций, вызывающих при переходе в гомозиготное состояние выраженное снижение жизнеспособности особей или их гибель. В более строгом смысле генетический груз в популяционной

генетике — это выражение уменьшения селективной ценности для популяции. Генетический груз рассматривается как мера непри приспособленности популяции к условиям окружающей среды. Существуют различные типы генетического груза.

Одной из его форм является *иммиграционный груз* (immigration load), когда за счет притока генов из других популяций или пород, происходит насыщение улучшаемой породы мутациями, наряду с положительными генами. Иммиграционный груз создается включением в данный генофонд посторонних генов, которые в новой генотипической среде понижают приспособленность. Ярким примером этого являются рецессивные миссенс-мутации голштинской породы [например, дефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD), комплекс аномалий позвоночника (CVM), брахиспина, или короткий позвоночник (BY)], которые вызывают ряд наследственных заболеваний у представителей черно-пестрого генеалогического корня.

Существует и другой тип мутаций. Они, являясь миссенс-мутациями, одновременно обладают кодоминантным типом наследования. К ним относятся аномальные варианты бета-казеина. Наиболее яркими представителями являются β -CN^{A1} и β -CN^B соответственно (Марзанов и др., 2019).

В XX столетии интенсивное использование мирового породного генофонда и биотехнологий репродукции (искусственного осеменения, трансплантации эмбрионов, клонирования) позволили значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных за счет получения потомства производителей — лидеров породы. Вместе с тем в поголовье все чаще проявляются признаки генетической эрозии — накопления груза вредных рецессивных мутаций. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость, жизнеспособность новорожденных и молодняка, резистентность, продолжительность хозяйственного использования животных, что отрицательно влияет на рентабельность производства (Жигачев, 2001; Марзанов и др., 2008).

Материалы и методы

Для диагностики некоторых молекулярно-генетических болезней были использованы разработанные ранее методы диагностики. Так, изучение геногеографии дефицита лейкоцитарной адгезии (BL), комплекса аномалий позвоночника (CV), брахиспины (BY), каппа-казеина (κ -CN) и бета-казеина (β -CN) проводили на основе разработанных собственных методик; по некоторым из них были получены патенты (Марзанова и др., 2016а, б, 2018а, б, 2019). Часть материалов была взята из различных зарубежных источников.

Результаты и обсуждение

У крупного рогатого скота выявлено свыше 400 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений (Millar et al., 2000). По шести породам с широким ареалом, которых разводят в России, наибольшее число таких отклонений зафиксировано в голштинской, далее следуют фризская, черно-пестрая, симментальская, бурая швицкая и айрширская породы. Отличие голштинской породы от других связано с особенностями разведения и воспроизводства. В породе, как известно, существует ограниченное число линий и родственных групп (Осборндейл Айвенго, Рефлекшен Соверинг, Монтвик Чифтейн и др.).

Кроме того, формирование популяций голштинского скота на его родине происходило при интенсивном использовании небольшого числа быков. Так, в родословных практически всех животных голштинской породы в 7–10-м рядах предков имеются гены, по крайней мере, одного из 20 быков-основателей. Таким образом, при формальном аутбридинге фактически трудно избежать подборов пар, в родословных которых нет «крови» этих основателей или их потомков.

С одной стороны, такая система разведения при интенсивном отборе способствует консолидации породы, но с другой — повышает вероятность накопления и перехода в гомозиготное состояние комплекса мутантных генов, обуславливающих различные нарушения.

Очевидно, голштинской породе скрытый сегрегационный груз мутаций передал голландский скот, от которого она ведет свое происхождение. Действительно, ряд аномалий встречается как у черно-пестрого голландского, фризского, так и у голштинского скота.

Согласно обобщенным данным, рецессивно наследуемая бульдожья форма ахондроплазии (локус 2004) встречается у голштинов в США, Канаде, британских фризов, фризов во Франции, Германии, Швеции, датского и польского черно-пестрого скота. Дефицит аргининсукцинатсинтетазы обнаружен у животных фризской породы в Австрии и голландской в США (локус 2039), артрогрипоз 1 — у черно-пестрой в Германии и голштинской в США (локус 2040), артрогрипоз передних конечностей 2 — у черно-пестрой в Германии и голштинской в Бразилии (локус 2045), врожденная катаракта 1 — голштинской в США, черно-пестрой и красно-пестрой (производная от голштинов с геном рецессивного окраса) в Германии (локус 2094). Пупочные грыжи (локус 2192) обнаружены с высокой частотой у черно-пестрого скота, голштинов в США, Канаде и ряде европейских стран, у фризов в Индонезии (Millar et al., 2000; Эрнст, Жигачев, 1990).

Следует отметить, что высокая частота пупочных грыж зарегистрирована в потомстве быка Заказника 82 голландской породы в совхозе «Сумино» Ленинградской области. Аналогичную патологию отмечали у родственников этого быка в Чехословакии, а также черно-пестрого скота в Германии при использовании быков-производителей из некоторых линий голштинского скота. О наследственных пупочных грыжах у голштинского скота сообщалось и ранее (Koch et al., 1957; Эрнст, Жигачев, 2006).

Еще один генетический дефект, наследуемый по аутосомно-рецессивному типу, двойная шейка матки зарегистрирован у коров немецкой черно-пестрой и шведской голштино-фризской пород (локус 2392). Описанные нарушения — пример прямого переноса мутантных генов из одной породы в другую, из одной страны в другую. В последнее время сложилась обратная ситуация: при использовании быков голштинской породы для «улучшения» популяций черно-пестрого скота в их генофонд одновременно с интродукцией полезных признаков были занесены рецессивные мутации, обуславливающие дефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD-синдром; 1-я группа сцепления; ген CD 18, обозначаемый также как локус 2244; выявлен у голштинов в ряде стран мира); комплекс аномалий позвоночника (CVM-синдром); нарушение свертывания крови (или дефицит фактора XI; рецессивная мутация в 17-й группе сцепления; локус 2068) и др. (Marion et al., 2004; Schutz et al., 2008; Марзанова, 2012; 2015).

Многие из перечисленных мутаций, представляющих собой характерный только для голштинов генетический груз, вероятно, возникли недавно, именно в этой породе, некоторые имеют более раннее происхождение. Это касается BLAD, CVM и BY, получивших широкое распространение в популяциях голштинского скота вследствие интенсивного использования в воспроизводстве потомков быка Осборндейл Айвенго 1189870 и прежде всего его внука Карлина М. Айвенго Белла 1667366. Сообщалось, что средняя частота гетерозиготных носителей BLAD-синдрома в начале исследований у голштинов в США и других странах составляла около 20 % (Игнатъев, 1996).

Проведен геногеографический анализ распространения наиболее известных мутаций (BL, CV, BY, κ-CN) у голштинской породы, как черно-пестрой, так и красно-пестрой масти (McVey, Tizard, 1993; Boichard, Amigüe, 1995; Марзанова и др., 2015; Епишко и др., 2017; Иванов и др., 2017).

В результате выбраковки быков-носителей наследственных болезней в 1990–2000 годы их число, однако, уменьшилось до минимума или не

осталось вообще. В последние годы появление быков-носителей связано с передачей мутаций от неаттестованных быковоспроизводящих матерей.

ЛИТЕРАТУРА

Епишко О.А., Пестис В.К., Танана Л.А., Кузьмина Т.И., Чебуранова Е.С., Шевченко М.Ю., Петрова А.П., Глинская Н.А., Трахимчик Р.В. Определение рецессивных мутаций VLAD, SVM И BS в популяции крупного рогатого скота молочного направления Республики Беларусь // Сборник научных трудов. Сельское хозяйство — проблемы и перспективы. Зоотехния. Гродно. ГГАУ, 2017. Т. 37. С. 44–51.

Жигачев А.И. Оценка производителей на скрытые генетические дефекты // Зоотехния. 2001. № 3. С. 10–12.

Иванов В.А., Марзанов Н.С., Елисеева Л.И., Таджиев К.П., Марзанова С.Н. Генотипы пород крупного рогатого скота и качество молока // Проблемы биологии продуктивных животных. 2017. № 3. С. 48–65.

Игнатъев В.М. Скрининг гена лейкоцитарной адгезии (VLAD-синдром) у животных черно-пестрого корня крупного рогатого скота: дис. ... канд. биол. наук. Дубровицы, 1998. 96 с.

Марзанов Н., Амерханов Х., Ескин Г., Турбина Г., Федорова Е., Турбина И., Саморуков Ю., Кийко Е., Попов Н., Шукюрова Е., Червяков Н., Девришов Д. Геногеография VLAD в популяциях черно-пестрого скота России и за рубежом // Молочное и мясное скотоводство. 2008. № 4. С. 2–5.

Марзанова С.Н., Нагорный В.А., Девришов Д.А., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Тохов М.Х., Ескин Г.В., Турбина И.С., Лукашина А.А., Марзанов Н.С. Эффект основателя и геногеография CV- и VL-мутаций у черно-пестрого скота // Российская сельскохозяйственная наука. 2015. № 6. С. 44–47.

Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Абылкасымов Д.А., Марзанова С.Н., Коновалова Н.В., Либет И.С., Новикова Л.Ф., Попов А.Н., Турбина И.С., Марзанова Л.К. Встречаемость β -CN^{A2} и β -CN^{A1} аллелей в локусе бетаказеина у крупного рогатого скота // Повышение конкурентоспособности животноводства и задачи кадрового обеспечения: Материалы XXV Международной научно-практической конференции / Российская академия менеджмента в животноводстве. Г.о. Подольск, пос. Быково, 2019. С. 134–143.

Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Марзанов Н.С. Набор последовательности праймеров и аллельспеци-

фических зондов для одновременной генодиагностики двух мутантных аллелей, вызывающих SVM и BLAD у крупного рогатого скота. Патент на изобретение RU № 2577990 С1. М.: ФИПС. Зарег. 18.02.2016.

Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Марзанов Н.С. Способ одновременной генодиагностики двух мутантных аллелей, вызывающих SVM и BLAD у крупного рогатого скота и тест-система для его осуществления. Патент на изобретение RU № 2601151 С2. М.: ФИПС. Зарег. 06.10.2016.

Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Марзанов Н.С. Набор последовательностей праймеров и аллельспецифических зондов для одновременной генодиагностики четырех мутантных аллелей каппа-казеина у крупного рогатого скота. Патент на изобретение RU № 2646140 С1. М.: ФИПС. Зарег. 01.03.2018.

Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Марзанов Н.С. Способ генодиагностики мутантного аллеля, вызывающего короткий позвоночник или брахиспину у крупного рогатого скота, и тест-система для его осуществления. Патент на изобретение RU № 2664454 С2. М.: ФИПС. Зарег. 17.08.2018.

Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Марзанов Н.С. Способ одновременной генодиагностики четырех мутантных аллелей каппа-казеина у крупного рогатого скота и тест-система для его осуществления. Патент на изобретение RU № 2691995 С2. М.: ФИПС. Зарег. 19.06.2019.

Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Профилактика генетических аномалий крупного рогатого скота. Л. Агропромиздат; Ленинградское отделение, 1990. 238 с.

Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции. М.: Россельхозакадемия, 2006. 382 с.

Boichard D., Amigues Y. Investigation on possible linkage between the BLAD gene and a QTL for production or type traits in Holstein cattle // 46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Prague. 1995. P. 4–7.

Haldane J.B.S. The cost of natural selection // *Journal of Genetics*. 1957. Vol. 55. No. 9. P. 511–524.

Koch P., Fischer H., Schumann F. Erbpathologie der landwirtschaftlichen Haustiere. Berlin–Hamburg: Parey Verlag, 1957. 436 S.

Marron B.M., Robinson J.L., Gentry P.A., Beever J.E. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle // *Animal Genetics*. 2004. Vol. 35. No. 6. P. 454–456.

McVey D.S., Tizard I. Primary immunodeficiencies of food animals // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1993. Vol. 9. No. 1. P. 65–75.

Mendelian Inheritance in Cattle / P. Millar, J.J. Lauvergne, C. Dolling (eds.). Wageningen. EAAP Publication No. 101. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Pers, 2000. 590 p.

Schütz E., Scharfenstein M., Brenig B. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the Holstein population // *Journal of Dairy Science*. 2008. Vol. 91. No. 12. P. 4854–4859.

Zsolnai A., Fesus L. Simultaneous analysis of bovine κ -casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes // *Animal Genetics*. 1996. Vol. 27. No. 3. P. 207–209.

Genetic burden of mutations in cattle breeds

Marzanov N.S.¹, Devrishov D.A.², Marzanova S.N.²

¹L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, Podolsk, Moscow Region, Russia;

²K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia.

Abstract

The aim of the work was to evaluate animal breeds by various types of mutations, the reasons for their occurrence and accumulation in herds. The definition of the concept of genetic load from the point of view of the development of modern molecular biology and the level of breeding work is considered. It is noted that the main reason for the accumulation of various forms of mutations is the tight selection of bulls and cows in highly productive breeds as well as the intensive sale of pedigree material (animals, embryos) from countries with a high level of development of dairy cattle breeding. The phenomenon of genetic burden requires special attention from specialists to obtain high-quality dairy products.

Key words: cattle, breed, allele, mutation, genetic load, immunodeficiency

УДК 636.082.12

Генетическая характеристика аллелофонда популяций крупного рогатого скота Сирии

Альмохаммад Альсалх Мохаммад, Бакай А.В., Лепёхина Т.В.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: mohmmadsalh95@yahoo.com; bakai46@mail.ru; tanya-charmed@mail.ru

Аннотация

Для изучения аллелофонда крупного рогатого скота Сирии породы Shami были использованы 11 микросателлитных локусов, которые показали 100%-ный уровень полиморфизма. Оценка консолидированности популяций по отнесению особей к собственной популяции показала, что 97,44% всех животных являются членами собственной популяции. Проведенный анализ выявил некоторый дефицит гетерозигот в обеих изученных популяциях на уровне 5,0% (СИР_Ш1) и 0,5% (СИР_Ш2).

Ключевые слова: крупный рогатый скот Сирии, породы, микросателлиты, полиморфизм

Введение

Животноводство — вторая по значению отрасль сельского хозяйства Сирии, развивающаяся преимущественно на экстенсивной основе. Общее поголовье коров в Сирии возросло с 837 тыс. в 2001 до 1100 тыс. голов в 2010 году. По производству молока выделяется сельская местность Дамаска — 306,5 тыс. тонн, далее Дэйр эз Зор — 244,8 тыс. тонн [5].

Крупный рогатый скот Сирии представлен животными местных и импортированных пород. Местный скот, по данным ФАО, представлен следующими породами: Akshi, Shami, Chesi, Jaulan и Lebanese. Наиболее распространенными можно считать животных пород Akshi и Shami [3].

Более высокий потенциал молочной продуктивности имеется у дамасского скота, представленного породой Shami, потому что именно скот Shami использовался для скрещивания с импортированным в Сирию из Нидерландов голштино-фризским скотом. Голштинский скот

впервые импортировался в страну в 1986 году, и этот процесс сохранялся на протяжении последующих лет, за исключением времени военных действий. Ввоз голштино-фризского скота объяснялся необходимостью компенсации сокращения дефицита рынка молока [4].

В связи с ввозом в страну новых генетических ресурсов возникает необходимость в изучении аллелофонда современного скота Сирии, принадлежащего к породе Shami.

Материалы и методы

В экспериментальных исследованиях было изучено 39 образцов, представляющих собой волосы с волосяной луковицей крупного рогатого скота из двух регионов Сирийской Арабской Республики — провинций Хама (СИР_Ш1, $n=23$) и Хомс (СИР_Ш2, $n=16$). Все животные принадлежат частным лицам и не входят в государственные программы селекционно-племенной работы.

Выделение ДНК проводили с использованием набора ДНК «S-Corb» (Россия, Синтол) согласно рекомендации производителя с нашими модификациями.

Для генетической характеристики были использованы молекулярные маркеры — микросателлиты. Для изучения аллелофонда крупного рогатого скота Сирии породы Shami были использованы 11 микросателлитных локусов: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, ETH225, BM1824, TGLA112, TGLA126, INRA23 и BM1818.

Продукты мультиплексной амплификации визуализировали при помощи капиллярного лазерного анализатора ABI3130xl (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) с применением программного обеспечения Gene Mapper, v. 4.

Статистическая обработка проведена с помощью программы GenAlEx 6.5 [2].

При выполнении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста.

Результаты и обсуждение

Среднее число аллелей на локус в зависимости от микросателлитного маркера варьировало от 14 (СИР_Ш1) и 12 (СИР_Ш2) в TGLA53 до 5 (СИР_Ш1) и 4 (СИР_Ш2) в TGLA126, что в среднем по 11 микросателлитам в изученных популяциях скота Сирии составило $7,86 \pm 0,62$ с диапазоном от $8,46 \pm 0,93$ в СИР_Ш1 до $7,27 \pm 0,82$ в СИР_Ш2 (рис. 1).

Число выявленных аллелей в локусе МС

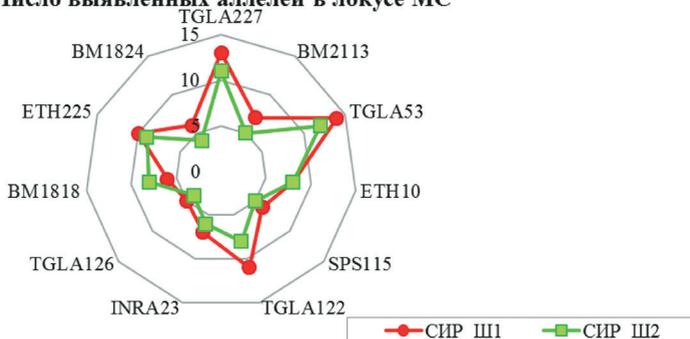


Рис. 1. Среднее число аллелей на локус в зависимости от микросателлитного маркера

Все 11 микросателлитных локусов показали 100%-ный уровень полиморфизма. Число информативных аллелей с частотой более 5% (N_a) было выше в выборке животных СИР_Ш1 — $5,82 \pm 0,77$ против $5,36 \pm 0,41$ в СИР_Ш2. Аналогичная тенденция выявлена по числу эффективных аллелей (N_e): у животных провинции Хама оно было максимальным и составило $5,47 \pm 0,89$ аллеля в сравнении с животными провинции Хомс — $4,72 \pm 0,59$ аллеля. Число частных аллелей у животных провинции Хама составило $2,46 \pm 0,43$, что практически в 2 раза выше, чем у особей провинции Хомс — $1,27 \pm 0,33$. Уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o) в изученных популяциях СИР_Ш1 и СИР_Ш2 составил $0,714 \pm 0,044$ и $0,754 \pm 0,043$ соответственно (рис. 2).

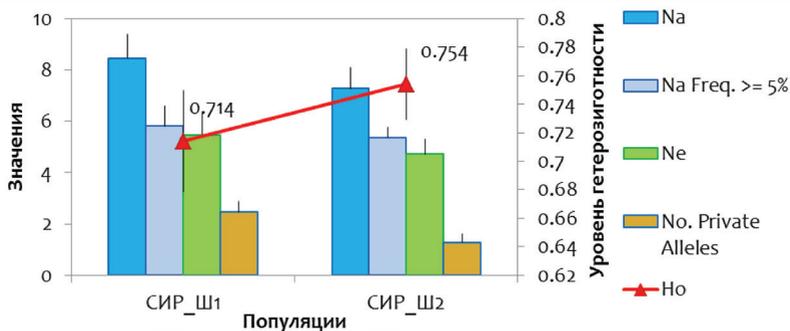


Рис. 2. Число информативных аллелей — число эффективных аллелей

Выявлен некоторый дефицит гетерозигот в двух популяциях на уровне соответственно 5,0 и 0,5%, на что указывают и положительные значения уровня индекса фиксации (F_{is}) в СИР_Ш1 и СИР_Ш2 — 6,9 и 0,5% соответственно. Анализ степени гетерозиготности в аспекте локусов показал неоднозначный вклад отдельных локусов в средний уровень гетерозиготности популяций скота. Оценка консолидированности популяций по отношению особей к собственной популяции показала, что на основании анализа микросателлитных маркеров 97,44% всех животных являются членами собственной популяции.

Генетические расстояния между исследуемыми популяциями СИР_Ш1 и СИР_Ш2 рассчитанные по Nei [1] и с использованием индекса фиксации F_{st} показали значения, свойственные группам животных в рамках одной породы 0,056 (UNeiP) и 0,02 (F_{st}).

ЛИТЕРАТУРА

1. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. 1978. Vol. 89. No. 3. P. 583–590.
2. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. No. 19. P. 2537–2539.
3. FAO: Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS). <http://www.fao.org/dad-is/en/>.
4. Orient Net: Samer Kakerli; Alkhairat.com. *Дата публикации: 2014-11-10 (Коровы в Сирии). المجلد (2012) العلوم الزراعية دمشق جامعة دمشق: 259 العدد 2 الصفحات: (28)

Genetic characteristics of allele pool of cattle populations in Syria

Mohammad Almohammad Alsalh, Bakai A.V., Lepekhina T.V.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

To study the allele pool of Syrian cattle of the Shami breed, 11 microsatellite loci were used, which showed a 100% level of polymorphism. Assessment of the consolidation of populations by classifying individuals as their own population showed that 97.44% of all animals are members of

their own population. The analysis revealed a certain deficit of heterozygotes in both studied populations at the level of 5.0% (SYR_Sh1) and 0.5% (SYR_Sh2).

Key words: Syrian cattle, breeds, microsatellites, polymorphism

Генетическая категоризация автохтонных пород овец Российской Федерации по микросателлитам

**Марзанов Н.С.,¹ Фейзуллаев Ф.Р.,² Корецкая Е.А.,³ Озеров М.Ю.,⁴
⁵ Малюченко О.П.⁶**

¹ ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Дубровицы, Подольск, Московская обл., Россия;

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Тверская государственная сельскохозяйственная академия», Тверская область, Россия;

⁴ Университет Турку, Турку, Финляндия;

⁵ Сельскохозяйственный научно-исследовательский центр Финляндии, Йокиоинен, Финляндия;

⁶ ООО «Синтол», Москва, Россия.

E-mail: nmarzanov@yandex.ru

Аннотация

Проведен генетический анализ 12 автохтонных пород овец, разводимых в различных регионах Российской Федерации по 20 локусам микросателлитов. Установлена частота встречаемости генотипов и аллелей в исследованных локусах. На основе полученных данных, проведена популяционно-генетическая оценка локальных пород овец по 5 показателям: наблюдаемой гетерозиготности (H_o), ожидаемой гетерозиготности (H_e), количеству аллелей, усредненному по минимальной выборке (r_k), среднему количеству аллелей в локусе (A_M) и коэффициенту инбридинга (f). Все 12 пород овец имеют близкий уровень генетического разнообразия. Так, средний уровень наблюдаемой гетерозиготности колеблется в пределах 0,73–0,80; ожидаемой — 0,71–0,81. В тоже время отмечена долготная тенденция повышения уровня наблюдаемой гетерозиготности с запада на восток Евразии — от 0,76 до 0,78. Аналогичная тенденция отмечалась по уровню ожидаемой гетерозиготности — от 0,76 до 0,79. Тенденция повышения уровня наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности кроется в более интенсивном потоке генов в сравнительно малочисленные и зачастую изолированные популяции овец Сибири и других азиатских частей территорий Российской Федерации

в результате различных стихийных скрещиваний или благодаря их высокому показателю жизнеспособности. Показано влияние внешней среды регионов на распределение частот аллелей, что очень важно для разработки породных стандартов по использованным локусам микросателлитов. Подсчитаны генетические расстояния между породами овец.

Ключевые слова: овцы, породы, микросателлиты, генотипы, аллели

Введение

В России имеется 46 пород овец (Амерханов, Федоренко, 2006; Тюриков, Павлов, 2010; Марзанов и др., 2017), из них 16 тонкорунных, 13 полутонкорунных, 2 полугрубошерстных и 15 грубошерстных пород, разводимых в различных регионах Российской Федерации. По данным ФАО, из 200 уникальных пород овец мира, четыре разводятся на территории бывшего СССР: каракульская, романовская, сараджинская и тушинская.

За последние годы наибольшее развитие получило овцеводство мясо-шерстного и мясо-шубного направлений, поскольку в современных условиях эффективность разведения овец, его рентабельность на 80% зависит от производства баранины и только на 20% от реализации шерсти и овчин.

Одной из выдающихся пород мясо-шубного направления, традиционно разводимых в Российской Федерации, является романовская порода. Овцы этой породы характеризуются непревзойденным естественным многоплодием. При нормальных условиях кормления и содержания каждые 100 маток дают за одно ягнение 260 ягнят, а подбор наиболее эффективных родительских пар позволяет повысить этот показатель (Ерохин и др., 2005). В силу своих генетических особенностей романовская порода закрытая. Нужно сказать это касается и других автохтонных пород овец, разводимых в различных регионах Российской Федерации.

В этой связи применение генетических маркеров позволяет правильно проводить оценку уровня гетерозиготности, облегчить и значительно ускорить селекционную работу, а также повысить эффективность использования животных при их разведении.

Целью исследований явилось проведение генетической категоризации 12 автохтонных пород овец по 20 локусам микросателлитов.

Материал и методы

Генетическую категоризацию 12 автохтонных пород овец, разводимых в разных условиях внешней среды, проводили по 20 локусам микросателлитов (табл. 1). В сравнительном аспекте были исследо-

ваны следующие породы овец: андийская, байдарак, дагестанская горная, дагестанская местная, каракульская, карачаевская, кулундинская, кучугуровская, лезгинская, тушинская и эдильбаевская. Из них четыре породы овец имеют азиатское происхождение (байдарак, каракульская, кулундинская, эдильбаевская) и восемь — европейское (андийская, дагестанская горная, дагестанская местная, карачаевская, кучугуровская, лезгинская, романовская, тушинская).

Анализ автохтонных пород овец проводили с помощью пяти популяционно-генетических параметров: H_o — наблюдаемой гетерозиготности; H_e — ожидаемой гетерозиготности; r_k — количества аллелей, усредненного по минимальной выборке; A_M — среднего количества аллелей в локусе; f — коэффициента инбридинга.

Межпородные отношения между 12 породами овец устанавливали методом оценки генетических расстояний D_A (Nei et al., 1983). Построение филогенетического древа проводили методом «ближайшего соседа» (Saitou, Nei, 1987) на основе генетических расстояний D_A с помощью программы POPULATIONS 1.2.3 (Langella, 2002). Достоверность полученной дендрограммы проверяли с помощью 1000 бутстреп-повторов по каждому использованному локусу микросателлитов.

Результаты и обсуждение

В процессе проведения исследований выявили то или иное количество аллелей (даны в скобках; см. также табл. 1) в следующих локусах микросателлитов, использованных в настоящей работе и выделенных ранее как у крупного рогатого скота: VM0757 ($n=7$); VM1314 ($n=16$); VM1818 ($n=15$); VM4621 ($n=22$); VM6506 ($n=10$); VM6526 ($n=13$); VM8125 ($n=11$); CSSM31 ($n=23$); INRA023 ($n=16$), так и у овец: MAF36 ($n=16$); MAF48 ($n=11$); MAF65 ($n=12$); McM527 ($n=13$); OarCP20 ($n=20$); OarCP34 ($n=9$); OarFCB48 ($n=16$); OarFCB128 ($n=27$); OarFCB304 ($n=16$); OarHH47 ($n=15$); OarVH72 ($n=10$).

На основе данных табл. 1 видно, что число встречаемых аллелей с учетом породных особенностей составило минимально от 3 и максимум до 16 по каждому локусу.

Всего же число установленных аллелей в каждом локусе колебалось от 7 (VM0757) до 27 (OarFCB128). При этом наименьшее количество аллелей было обнаружено у овец андийской породы ($n=162$), а максимальное количество — у каракульских овец ($n=202$).

В табл. 2 показаны результаты проведенного анализа автохтонных пород овец по пяти популяционно-генетическим параметрам и,

в частности, суммированы показатели генетической изменчивости 12 пород по 20 микросателлитам. Все 12 пород овец имеют близкий уровень генетического разнообразия. Так, средний уровень наблюдаемой гетерозиготности колеблется в пределах 0,73–0,80; ожидаемой — 0,71–0,81.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности был наименьшим у овец романовской породы (0,73) и наибольшим — у овец породы байда-рак (0,80). Уровень ожидаемой гетерозиготности был минимальным у кучугуровской породы (0,71), а затем у романовских овец (0,72). Максимальной величиной обладали каракульская (0,81), затем лезгинская (0,80) и тушинская (0,80) породы овец.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности в исследуемых породах мало отличается от показателя уровня ожидаемой гетерозиготности. В то же время отмечена долготная тенденция повышения уровня наблюдаемой гетерозиготности с запада на восток Евразии от 0,76 до 0,78. Аналогичная тенденция отмечалась по уровню ожидаемой гетерозиготности — от 0,76 до 0,79.

Причина такой тенденции повышения уровня наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности кроется в более интенсивном потоке генов в сравнительно малочисленные и зачастую изолированные популяции овец Сибири и других азиатских частей территорий Российской Федерации в результате различных стихийных скрещиваний или благодаря их высокому показателю жизнеспособности.

Что же касается Европейской части Российской Федерации, то здесь действие потока генов нивелируется, то есть сглаживается интенсивными методами селекции или инбридингом. Особенно пагубные последствия начались и отмечаются сейчас, в связи с разрушением колхозов и совхозов, в которых были специалисты, контролировавшие селекционно-генетические процессы у разводимых пород овец, и проводилась определенная племенная работа.

Генетиками предложены различные методы контроля селекционно-генетических процессов в стадах овец. Так, с целью сохранения генетического внутривидового разнообразия большой интерес представляет коэффициент богатства аллелей, или количество аллелей, усреднённое по минимальной выборке (r_k).

Исходя из данных табл. 2, наибольшим показателем богатства аллелей обладает каракульская (6,97), затем эдильбаевская (6,75) и тушинская (6,69) породы овец. Наименьшими показателями богатства аллелей обладали романовская (5,12), кучугуровская (5,22) и дагестанская горная (5,84) породы овец соответственно.

Таблица 1. Число аллелей у различных пород овец по 20 локусам микросателлитов

Породы	Анлий- ская	Байда- рак	Даге- стан- ская горная	Даге- стан- ская местная	Кара- куль- ская	Карака- евская	Кулун- дическая	Кучугу- ровская	Лезгин- ская	Рома- новская	Тушин- ская	Эдиль- бав- ская	Всего аллелей в локусе
Локусы													
BM0757	5	6	6	5	6	6	6	5	6	6	6	6	7
BM1314	9	13	11	10	13	13	12	14	11	7	13	11	16
BM1818	11	10	11	12	11	13	11	10	12	7	13	11	15
BM4621	12	14	13	10	16	16	13	13	11	7	15	13	22
BM6506	4	3	5	5	6	7	6	6	7	3	6	5	10
BM6526	7	7	8	9	10	7	8	5	10	5	6	10	13
BM8125	7	6	7	6	6	6	6	7	8	6	6	8	11
CSSM31	11	14	8	7	14	14	15	9	15	8	13	12	23
INRA023	13	12	10	10	13	12	13	10	14	9	14	13	16
MAF36	8	12	12	10	8	10	10	6	13	5	11	9	16
MAF48	6	8	8	7	8	8	7	6	8	4	8	8	11
MAF65	6	8	3	5	8	9	7	7	8	8	10	11	12
McM527	7	8	11	6	12	9	9	8	8	6	7	7	13
OarCP20	8	7	7	8	8	8	7	7	8	6	8	7	13
OarCP34	5	7	6	5	8	7	7	6	7	5	7	7	9
OarFCB48	8	7	7	9	9	7	8	7	11	7	8	9	16
OarFCB128	10	11	9	8	16	12	10	8	9	9	15	13	27
OarFCB304	9	10	8	8	12	10	9	7	9	6	12	11	16
OarHN47	9	13	8	11	12	9	12	5	14	8	12	13	15
OarVH72	7	8	8	7	6	6	8	6	8	6	8	7	10
Всего аллелей	162	184	166	158	202	189	184	152	197	128	198	191	291

Таблица 2. Характеристика автохтонных пород овец Российской Федерации по пяти популяционно-генетическим параметрам

Порода	N	H_O	H_E	r_k	A_M	f
Андийская	38	0,74	0,76	5,88	8,10	0,027
Байдарак	34	0,80	0,78	6,42	9,20	-0,020
Дагестанская горная	39	0,74	0,76	5,84	8,30	0,027
Дагестанская местная	20	0,78	0,79	6,47	7,90	0,010
Каракульская	37	0,77	0,81	6,97	10,10	0,050
Карачаевская	39	0,77	0,77	6,38	9,45	-0,001
Кулундинская	40	0,77	0,78	6,42	9,20	0,016
Кучугуровская	40	0,78	0,71	5,22	7,60	-0,093
Лезгинская	40	0,78	0,80	6,62	9,85	0,022
Романовская	29	0,73	0,72	5,12	6,40	-0,008
Тушинская	39	0,79	0,80	6,69	9,90	0,016
Эдильбаевская	32	0,78	0,79	6,75	9,55	0,021

Примечание: N — размер выборки; H_E — ожидаемая и H_O — наблюдаемая гетерозиготность; r_k — богатство аллелей (количество аллелей, усреднённое по минимальной выборке); A_M — среднее количество аллелей в локусе; f — внутрипородный коэффициент инбридинга.

Проведенное исследование указывает на наличие региональных особенностей в распределении аллельных частот и вызывает необходимость разработки породных стандартов — аллельных вариантов маркирующих систем, используемых в популяционно-генетических исследованиях у овец.

Что касается показателя A_M или среднего количества аллелей в локусе, наибольшими его величинами обладали каракульская (10,10), тушинская (9,90) и лезгинская (9,85) породы овец (табл. 2). Меньше всего величина этого показателя была представлена у романовской (6,40), кучугуровской (7,60) и дагестанской местной (7,90) исследованных пород овец. Показатель A_M также является важным популяционно-генетическим признаком, отражающим биоразнообразие конкретного локуса у изучаемой породы овец. Как видим, наименьшие его значения получены по тем породам, которые характеризуются определенной спецификой в разведении (романовская), незначительностью поголовья (кучугуровская) и географической изоляцией (дагестанская местная).

У 12 автохтонных пород овец вычисляли значение внутрипородного коэффициента инбридинга (f). Как видно из табл. 2, четыре породы обладали отрицательным значением этого коэффициента (байдарак, карачаевская, кучугуровская, романовская), а восемь (андийская, дагестанская

горная, дагестанская местная, каракульская, кулундинская, лезгинская, тушинская, эдильбаевская) — положительным. У тех пород овец, у которых значение f имеют отрицательное значение, отмечается избыток гетерозигот. У остальных 8 автохтонных пород овец, у них этого явления нет. Данные, полученные в процессе обработки материалов, показывают также отсутствие нарушения генетического равновесия ($p > 0,05$).

Использование ДНК-маркеров, в частности, микросателлитов, в качестве генетического инструмента позволяет выявлять высокий уровень их изменчивости и их большие возможности в качестве маркирующих систем у овец.

Микросателлитный анализ 12 автохтонных пород овец, разводимых на территории Российской Федерации показывает (табл. 3), что наибольшие генетические расстояния отмечены между дагестанской горной и кучугуровской породами (0,1059), а также между той же дагестанской горной и романовской породами овец (0,1030).

Минимальные величины генетических расстояний были получены между тушинской и эдильбаевской породами овец (0,002). Между остальными породами генетические дистанции находятся в пределах от 0,0089 до 0,0972, что связано с высоким уровнем гетерозиготности исследуемых популяций (табл. 3).

Как видно из рис. 1, исследованные породы формируют три группы кластеров. Одна из ветвей представлена карачаевской породой. К ней примыкает пара уникальных пород: тушинская и байдакар.

Ниже расположилась большая группа овец из Республики Дагестан. Отдельной демой идут дагестанская горная и лезгинская породы. Близки друг другу две старые местные породы: андийская и дагестанская местная.

Третья ветвь в свою очередь состоит из трех дем и представлена пятью породами овец: кучугуровской, романовской, кулундинской, каракульской и эдильбаевской.

Кучугуровская, старинная ногайская порода овец, остатки которой находятся в частных фермерских и любительских хозяйствах Воронежской области. От нее отходит дема, на которой расположены еще две не менее старинные породы: романовская и кулундинская.

Романовская порода шубно-мехового направления продуктивности, по одним данным создана на территории Ярославской и других прилегающих областей, по другим — пришла вместе с романовскими ногайцами на территорию нынешней Ярославской области (Керейтов, 2006). По третьей версии пришла с монголо-татарами и длительное время разводится на территории Центральной России (Марзанов, Магомадов, 1997).

Таблица 3. Определение генетических расстояний с помощью индекса фиксации между автохтонными породами овец Российской Федерации

Породы	Андий- ская	Байда- рак	Даге- стан- ская горная	Даге- стан- ская мест- ная	Кара- куль- ская	Кара- чаев- ская	Кулун- дин- ская	Кучу- гуров- ская	Лезгин- ская	Романов- ская	Тушин- ская	Эдиль- баев- ская
Андийская	×											
Байдарак	0,0422	×										
Дагестанская горная	0,0612	0,0537	×									
Дагестанская местная	0,0282	0,0218	0,0376	×								
Каракульская	0,0376	0,0275	0,0426	0,0148	×							
Карачаевская	0,0407	0,0198	0,0358	0,0191	0,0182	×						
Кулундинская	0,0476	0,0234	0,0373	0,0209	0,0195	0,018	×					
Кучугуровская	0,0911	0,0771	0,1059	0,084	0,0722	0,076	0,0714	×				
Лезгинская	0,0343	0,0197	0,0297	0,0089	0,0166	0,0145	0,0211	0,0776	×			
Романовская	0,0972	0,0756	0,1030	0,0763	0,073	0,0832	0,0585	0,1382	0,0756	×		
Тушинская	0,036	0,0154	0,034	0,0147	0,0145	0,0112	0,0224	0,0781	0,0096	0,0767	×	
Эдильбаевская	0,0381	0,0162	0,0449	0,0149	0,0147	0,0095	0,0222	0,0786	0,0099	0,0748	0,002	×



Рис. 4. Дендрограмма кластеров анализируемых автохтонных пород овец

Кулундинскую породу овец считали любимой овцой Чингиз-хана. Еще дальше от них расположились две знаменитые азиатские породы: каракульская и эдильбаевская. Каракульская порода овец считается одной из самых древних пород на территории бывшего СССР. Ее вывели народы Средней Азии путём умелого отбора и подбора, в благоприятных природных и кормовых условиях для выращивания подобных овец.

В отношении эдильбаевской породы известно, что ее корни прослеживаются на территории современных Саратовской области Российской Федерации и Западно-Казахстанской области (ранее Уральской области) Республики Казахстан. Считается, что ее создателем является казах-овцевод по имени Эдильбай, откуда произошло ее название. Некоторые казахи породу иногда называют Едилбай (Канапин, 2009).

Наряду с проводимым генетическим скринингом российских автотонных пород овец, необходимы дополнительные исследования по уточнению некоторых исторических фактов их происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерохин А.И., Карасев Е.А., Ерохин С.А. Романовская порода овец: состояние, совершенствование, использование генофонда / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации. М., 2005. 329 с.
2. Канапин К. Едилбаевская овца: монография. Алматы, Казахстан: Бастау, 2009. 182 с.
3. Керейтов Р. Краткий историко-этнографический очерк // Возрождение. 2006. № 9. С. 12–15.
4. Марзанов Н.С., Магомадов Т.А. Аллелофонд овец романовской породы // Сельскохозяйственная биология. 1997. № 2. С. 37–41.
5. Марзанов Н.С., Фейзуллаев Ф.Р., Марзанова Л.К., Комкова Е.А., Озеров М.Ю., Кантанен Ю., Лазебный О.Е., Марзанова С.Н. Оценка аллелофонда овец полутонкорунных пород по различным типам генетических маркеров. М.: ЗооВетКнига, 2017. 67 с.
6. Породы племенных сельскохозяйственных животных и птицы, распространенные в Российской Федерации / Каталог, под ред. Х.А. Амерханова и В.Ф. Федоренко. М.: Росинформагротех, 2006. 59 с.
7. Тюриков В.М., Павлов М.Б. Новые породы и типы овец и коз России / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Федер. гос. науч. учреждение «Всерос. науч.-исслед. ин-т плем. Дела» (ФГНУ ВНИИплем). Лесные поляны (Моск. обл.): Изд-во ВНИИплем, 2010. 24 с.
8. Langella O. Populations 1.2.32 (02/13/2011): a population genetic software. CNRS UPR9034. Available at <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>. 1999.

9. Nei M., Tajima F., Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data // *Journal of Molecular Evolution*. 1983. Vol. 19. No. 2. P. 153–170.

10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4. No. 4. P. 406–425.

Genetic categorization of autochthonous sheep breeds of the Russian Federation by microsatellites

Marzanov N.S.¹, Feizullaev F.R.², Koretskaya E.A.³, Ozerov M.Yu.^{4,5}, Ma-lyuchenko O.P.⁶

¹L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, Podolsk, Moscow Region, Russia;

²K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

³Tver State Agricultural Academy, Tver, Russia;

⁴University of Turku, Turku, Finland;

⁵MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland;

⁶Syntol LLC, Moscow, Russia.

Abstract

Genetic analysis at 20 loci of microsatellites was made for 12 autochthonous sheep breeds maintained in various regions of the Russian Federation. The frequency of occurrence of genotypes and alleles at the studied loci was established. Based on the obtained data, a population-genetic assessment of local sheep breeds was carried out according to 5 indicators: observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), the number of alleles averaged over the minimum sample (r_k), the average number of alleles at the locus (A_M), and the coefficient inbreeding (f). All 12 sheep breeds had a close level of genetic diversity. So, the average level of observed heterozygosity ranged between 0.73 and 0.80 and that of expected heterozygosity between 0.71 and 0.81. At the same time, a longitudinal tendency towards an increase in the level of observed heterozygosity from west to east of Eurasia, from 0.76 to 0.78, was noted. A similar trend was noted in the level of expected heterozygosity, from 0.76 to 0.79. The tendency to increase the level of observed and expected heterozygosity lies in a more intense flow of genes into relatively small and often isolated populations of sheep of Siberia and other Asian parts of the Russian Federation as a result of various spontaneous

crosses or due to their high viability index. The influence of the regional environment on the distribution of allele frequencies was shown, which is very important for the development of breed standards for the used microsatellite loci. The genetic distances between the breeds of sheep were calculated.

Key words: sheep, breeds, microsatellites, genotypes, alleles

Молекулярно-биологические исследования при диагностике различных болезней животных и контроле безопасности пищевых продуктов и кормов в Российской Федерации

Белоусов В.И.,¹ Варенцова А.А.,¹ Девришова З.С.,¹ Пантаз Ю.С.,¹ Немков Г.Г.²

¹ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия.

E-mail: vibelousov51@mail.ru

Аннотация

В Российской Федерации в государственных ветеринарных лабораториях ежегодно осуществляется от 110 до 120 млн исследований. Методом ПЦР ежегодно проводится около 2 млн исследований. На долю субъектных ветеринарных лабораторий приходится 0,97%, а на долю учреждений Россельхознадзора 2% исследований методом ПЦР.

При этом в биологическом и патологическом материалах выявляли геномы возбудителей 74 наименований заразных болезней, в том числе 26 бактериальных, 43 вирусных и 5 протозойных болезней животных. Среди бактериальных болезней в биологическом материале наиболее часто выявляли геномы: *Escherichia coli* (53,5%), возбудителей инфекционной энтеротоксемии свиней (42,4%), бордетелл (19,4%), микоплазм (13%) и стрептококков свиней (13%). Среди вирусных болезней чаще выявляли геномы вирусов панлейкопении кошек (63%), ротавирусов (29,4%), коронавируса (28,0%), болезни Марека (27,1%), инфекционного бронхита кур (23,1%) и цирковируса свиней (22,3%).

В 2018 году в ветеринарных лабораториях России было исследовано на наличие ГМО 9716 проб кормов и кормовых добавок и получен 31 положительный результат (0,3%). Учреждениями Россельхознадзора за этот период исследовано 72544 проб зерна, кормов растительного и животного происхождения, комбикормов и кормовых добавок, при этом получено 3875 положительных результатов (5,3%). Было также исследовано 5388 проб пищевых продуктов, в которых в 467 случаях выявле-

ны ГМО (8,7%). Наибольшее количество ГМО выявлено в мясе птицы (8,9%), готовых мясных продуктах (11,3%), рыбе (15,4%), икре и молочках (19,2%).

Ключевые слова: молекулярно-биологические исследования, ПЦР, инфекционные болезни животных, диагностика

По данным, предоставленным ветеринарными лабораториями субъектов Российской Федерации (РФ) на 01.01.2019 г., в РФ функционируют 1716 государственных ветлабораторий, в том числе областных, краевых и республиканских — 69, зональных — 48; межотраслевых — 1, окружных — 2, межрайонных — 163, районных — 513, диагностических отделов — 48, диагностических кабинетов — 109, лабораторий ВСЭ на рынках и перерабатывающих предприятиях — 766. В системе Россельхознадзора в сфере ветеринарии работает 31 федеральное государственное бюджетное учреждение (ФГБУ). Лаборатории приобретают электронные базы данных нормативной документации «Техэксперт», «Консультант Плюс» и «Стандартинформ», позволяющие оперативно и легально получать необходимый документ.

В настоящее время на территории РФ осуществляют свою деятельность и частные ветеринарные лаборатории, которые обслуживают как владельцев мелких домашних животных, индивидуальных предпринимателей, занимающихся разведением животных, так и крупные животноводческие предприятия. Деятельность таких лабораторий не регламентируется действующими нормативными документами в сфере ветеринарии и никем не контролируется. ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (ЦНМВЛ) в настоящее время не имеет доступа к проверкам деятельности ветеринарных лабораторий субъектов РФ, так как по решению Минюста России и приказу Минсельхоза РФ № 399 от 16.08.2007 г. отменено Положение об аттестации ветеринарных лабораторий РФ.

В связи со вступлением в силу Федерального закона № 294-ФЗ от 26.12.2008 г. «О защите прав юридических лиц и индивидуальных предпринимателей при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля» проведение государственного контроля и надзора должно осуществляться с 01.05.2009 г. исключительно органами государственного контроля (надзора) и их должностными лицами. ФГБУ ЦНМВЛ не имеет полномочий осуществления государственного контроля (надзора). Письмом Департамента ветеринарии Минсельхоза России № 25-25/447 от 22.06.2009 г. ФГБУ ЦНМВЛ запрещено

проводить контрольные (надзорные) мероприятия в ветеринарных лабораториях субъектов РФ. Отсутствие методического контроля за деятельностью ветеринарных лабораторий может привести к техническим барьерам в торговле вследствие нарушений единства аналитических измерений, что недопустимо стране-члену ВТО. В ряде субъектов РФ субъектные ветеринарные лаборатории отсутствуют, их функции выполняют ФГБУ Россельхознадзора.

В государственных ветеринарных лабораториях субъектов РФ ежегодно проводится 110–120 млн исследований, в федеральных учреждениях Россельхознадзора — свыше 18 млн исследований.

При анализе уровня проводимых исследований следует отметить, что в лабораториях субъектов РФ выполняется примерно 28,8% технически сложных анализов, с использованием нового оборудования и требующих высокой квалификации специалистов, исследований, в то время как в лабораторных учреждениях Россельхознадзора на долю таких исследований приходится 71,2%.

Учреждения Россельхознадзора по отношению к субъектным ветлабораториям выполняют больше исследований, использующих новые, современные методы: в частности, на 27% больше вирусологических исследований, на 24% — исследований методом ИФА, на 55% — методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), на 50% — химических исследований, а технически сложных химических исследований свыше 80%.

Молекулярно-биологические исследования в настоящее время проводятся практически во всех ФГБУ Россельхознадзора, областных, краевых и республиканских ветеринарных лабораториях Российской Федерации. Эти исследования испытательные лаборатории проводят с целью диагностики заразных болезней животных, контроля генно-модифицированных (трансгенных) организмов (ГМО) в кормах и выявления РНК или ДНК возбудителей болезней животных в продуктах животного происхождения.

В субъектных ветеринарных лабораториях на долю исследований, проведенных с использованием ПЦР, приходится 1,1 млн исследований (0,97%), а в учреждениях Россельхознадзора проводится более 2% ПЦР исследований.

В табл. 1 приведен перечень болезней, диагностируемых методом ПЦР в государственных ветеринарных лабораториях России.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что ПЦР используется в ветеринарных лабораториях для выявления генома возбудителей 74 наименований заразных болезней, в том числе 26 бактериальных, 43 вирусных и 5 протозойных болезней животных.

Среди бактериальных болезней в биологическом материале наиболее часто выявляли геномы: *Escherichia coli* (53,5%), возбудителей инфекционной энтеротоксемии свиней (42,4%), бордетелл (19,4%), микоплазм (13%) и стрептококков свиней (13%).

Таблица 1. Результаты диагностики заразных болезней животных в ветеринарных лабораториях России методом ПЦР

№ п/п	Наименование болезни	Количество проведенных исследований	Количество положительных результатов
Бактериальные болезни			
1	Актинобациллезия плевропневмония	1288	54 (4,2%)
2	Бордетеллез	526	102 (19,4%)
3	Бруцеллез	2545	1 (0,03%)
4	Болезнь Глессера	2974	104 (3,5)
5	Гемофильная плевропневмония	124	7 (5,6%)
6	Гемофилез птиц	147	7 (4,8%)
7	Дизентерия свиней	616	5 (0,8%)
8	Инфекционная энтеротоксемия	745	316 (42,4%)
9	Иерсиниоз	24	0
10	Кампилобактериоз	218	3 (1,4%)
11	Колибактериоз	443	237 (53,5%)
12	Листериоз	247	0
13	Лептоспироз	4673	58 (1,2%)
14	Микоплазмоз	12490	1620 (13,0%)
15	Некробактериоз	6	1
16	Орнитобактериоз	22	2 (9,1%)
17	Паратуберкулезный энтерит	74	0
18	Паратуберкулез	223	1 (0,4%)
19	Пастереллез	2387	145 (6,1%)
20	Пролиферативная энтеропатия	407	25 (6,1%)
21	Рожа	5	1
22	Сибирская язва	258	0
23	Сальмонеллез	3037	198 (6,5%)
24	Стафилококкоз	95	1 (1,1%)
25	Стрептококкоз	1073	141 (13,1%)
26	Туберкулез	1519	2 (0,1%)
Вирусные болезни			
1	Аденовирусная инфекция	173	24 (13,9%)
2	Алеутская болезнь	667	0
3	АЧС	1717	12 (0,7%)
4	Болезнь Ауески	1711	23 (1,3%)
5	Болезнь Гамборо	407	0
6	Болезнь Марека	314	85 (27,1%)
7	Болезнь Тешена	718	0
8	Болезнь Ньюкасла	5431	26 (0,5%)
9	Блютанг	2091	0
10	Болезнь Шмалленберга	26233	3 (0,01%)
11	Везикулярная болезнь	728	0
12	Вирусная диарея	2203	44 (2,0%)
13	Вирусный гепатит	14	0

Продолжение таблицы

№ п/п	Наименование болезни	Количество проведенных исследований	Количество положительных результатов
14	Вирусная геморрагическая септицемия	6	0
15	Вирусный трансмиссивный энтерит	430	2 (0,5%)
16	Вирусный энтерит	1	1
17	Грипп свиней	3890	1 (0,02%)
18	Грипп птиц	25369	473 (1,9%)
19	ИРТ	2274	77 (3,4%)
20	Инфекционный некроз поджелудочной железы	6	0
21	Инфекционный бронхит кур	389	90 (23,1%)
22	Инфекционная анемия птиц	5	2
23	Инфекционный энцефаломиелит	116	0
24	Коронавирусная инфекция	486	136 (28,0%)
25	КЧС	58928	14 (0,02%)
26	Лейкемия кошек	68	7 (10,3%)
27	Лейкоз КРС	12213	1133 (9,3%)
	Лейкоз птиц	158	0
28	Нодулярный дерматит	12933	144 (1,1%)
29	Оспа овец	58	4 (6,9%)
	Оспа птиц	34	1 (2,9%)
30	Панлейкопения кошек	27	17 (63,0%)
31	Парвовирусный энтерит	7	5
32	Парвовирусные инфекции	618	80 (12,9%)
33	Пневмовирусные инфекции	92	14 (15,2%)
34	Реовирусные инфекции	28	0
35	РРСС	11452	244 (2,1%)
36	Респираторная синцитиальная инфекция	156	5 (3,2%)
37	Ротавирусная инфекция	650	191 (29,4%)
38	ССЯ	12	0
39	Хламидные инфекции КРС	2870	14 (0,5%)
39а	Хламидные инфекции МРС	24	1 (4,2%)
39б	Хламидные инфекции свиней	3401	64 (1,9%)
39в	Хламидные инфекции птиц	3836	39 (1,0%)
39г	Хламидные инфекции собак	27	4 (14,8%)
39д	Хламидные инфекции кошек	34	4 (11,8%)
40	Цирковирусная инфекция свиней	864	193 (22,3%)
41	Чума плотоядных	14	0
42	Эпидемическая диарея свиней	457	3 (0,7%)
43	Ящур	1265	3 (0,2%)
Протозоозы			
1	Токсоплазмоз собак	28	0
2	Дирофиляриоз собак	3	1
3	Анаплазмоз	3	0
4	Бабезиоз	3	0
5	Боррелиоз (клещ)	1	1

Среди вирусных болезней чаще выявляли геномы вирусов панлейкопении кошек (63%), ротавирусов (29,4%), коронавирусов (28,0%), болезни Марека (27,1%), инфекционного бронхита кур (23,1%) и цирковируса свиней (22,3%).

Особое внимание следует уделить контролю ГМО в кормах. В настоящее время в России зарегистрировано 26 ГМ-линий 5 видов растений (9 линий сои, 13 линий кукурузы, 1 линия риса, 1 линия сахарной свеклы, 2 линии картофеля), которые разрешены для использования в продуктах питания, продовольственном сырье и кормах. Наборы реагентов серии «ГМО идентификация» позволяют решить наиболее важную и сложную задачу идентификации линий ГМ-растений. Линейка наборов этой серии содержит как наборы для идентификации какой-либо одной конкретной ГМ-линии, так и наборы для идентификации сразу нескольких линий. Все учреждения Россельхознадзора осуществляют контроль ГМО в кормах отечественного и импортного производства. При производстве кормов и кормовых добавок из сырья, полученного с использованием ГМО растительного, животного и микробного происхождения, используются зарегистрированные на территории РФ линии ГМО.

Корма, содержащие незарегистрированные компоненты ГМО в количестве 0,5% и менее каждого из компонентов, считаются случайной или технически неустранимой примесью, не относятся к категории кормов, полученных с применением ГМО, и используются без ограничений. Корма, содержащие зарегистрированные компоненты ГМО в количестве 0,9% и менее каждого из компонентов, также являются случайной или технически неустранимой примесью, не относятся к категории кормов, полученных с применением ГМО, и используются без ограничений. Лабораторный контроль безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для их производства осуществляется в РФ, как и во всем мире, государственной ветеринарной службой как гарантия получения безопасных для человека пищевых продуктов животного происхождения, а также для обеспечения здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных.

Исследование продукции и сельскохозяйственного сырья на наличие ГМО в ветеринарных лабораториях обычно проводится по следующей системе:

1. 1. Скрининговая качественная диагностика с применением высокочувствительных и надежных аналитических методов, охватывающих максимально возможное количество вариантов ГМО.
2. 2. При выявлении ГМО проводят идентификацию линий.
3. 3. Проводят количественное определение ГМО с целью установления содержания в образце.

В тест-системах ГМО используется метод ПЦР в реальном времени — наиболее надёжный метод тестирования ГМО, который позволяет провести как качественный, так и количественный анализ. Метод этот высокочувствительный и высокоточный: чувствительность тест-систем — не более 10 копий ДНК или не более 0,01% ДНК ГМ-растений, специфичность — 100%. Наличие реакции внутреннего положительного контроля (ВПК) позволяет исключить ложноотрицательные результаты; внедрены автоматизация выделения ДНК и автоматическая обработка результатов анализа.

Учреждения Россельхознадзора ежегодно осуществляют контроль кормов на наличие ГМО в рамках государственных заданий и мониторинговых исследований. В 2018 году в ветеринарных лабораториях России было исследовано на наличие ГМО 9716 проб кормов и кормовых добавок и получен 31 положительный результат (0,3%), из которых в 27 случаях выявлены незарегистрированные линии ГМО. Учреждениями Россельхознадзора за этот период исследовано 72544 проб зерна, кормов растительного и животного происхождения, комбикормов и кормовых добавок, при этом получено 3875 положительных результатов (5,3%), из них 677 случаев приходилось на незарегистрированные линии ГМО. Было также исследовано 5388 проб пищевых продуктов, в которых в 467 случаев (8,7%) выявлены ГМО. Наибольшее количество ГМО выявлено в мясе птицы (8,9%), готовых мясных продуктах (11,3%), рыбе (15,4%), икре и молоках (19,2%).

Для внесения в область аккредитации метода исследований каждая лаборатория проводит верификацию применяемой методики для подтверждения ее пригодности и использования в лаборатории. Только при наличии протоколов верификации Росаккредитация утверждает область аккредитации.

В данной статье нами приводятся результаты верификации методики выявления РНК вируса блютанга (*Bluetongue virus*, BTV) в биологическом материале от жвачных методом совмещенной реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени проведенные в соответствии с требованиями инструкции по применению набора реагентов «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» (организация-производитель ООО «ВЕТ ФАКТОР», Москва, Троицк).

Целью верификации методики являлись определение специфичности, повторяемости и воспроизводимости и установление пригодности методики при ее использовании в ФГБУ ЦНМВЛ.

В работе в качестве матрицы использовали по 5 контрольных образцов BTV с наличием вируса блютанга в разведениях 10^1 , 10^2 ,

10³, 10⁴, 10⁵ и 5 образцов стерильного физраствора без наличия фрагментов генома вируса блютанга. Амплификацию проводили на приборах Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Исследования проводились двумя операторами; были получены следующие результаты (табл. 2).

Таблица 2. Результаты верификации методики выявления РНК вируса блютанга

Параметры верификации	Контролируемые показатели	Установленные значения
Специфичность	Обнаружение РНК вируса блютанга	1. Обнаружение РНК вируса блютанга в 100% случаях в образцах ПКО ВТУ. 2. Отсутствие РНК вируса блютанга в 100% случаях в стерильном физиологическом растворе.
Повторяемость	Определение степени близости результатов при обнаружении ДНК свиньи в условиях повторяемости	1. Обнаружение РНК вируса блютанга в 100% случаях в образцах ПКО ВТУ при проведении испытаний на приборе Rotor-Gene 6000/ Q оператором 1. 2. Отсутствие РНК вируса блютанга в 100% случаях в стерильном физиологическом растворе при проведении испытаний на приборе Rotor-Gene 6000/ Q оператором 1.
Воспроизводимость	Определение степени близости результатов при обнаружении ДНК свиньи в условиях воспроизводимости	1. Обнаружение РНК вируса блютанга в 100% случаях в образцах мяса свиньи при проведении испытаний на приборе CFX96 Touch оператором 2. 2. Отсутствие РНК вируса блютанга в 100% случаях в стерильном физиологическом растворе при проведении испытаний на приборе CFX96 Touch оператором 2.

Результаты испытаний исследуемых образцов с целью верификации данной методики подтвердили 100%-ную специфичность набора реагентов «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР».

Во всех образцах, содержащих РНК вируса блютанга, обнаружен геном вируса блютанга; во всех образцах, не содержащих РНК вируса блютанга, геном вируса блютанга не обнаружен.

Повторяемость результатов, а также их воспроизводимость составили не менее 95%, что соответствует заданным показателям точности метода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донник И.М., Пелевина Н.А, Бодрова О.Г. ПЦР-диагностика вирусных и бактериальных инфекций домашних животных // БИО. 2007. № 7. С. 13–16.
2. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы / [отв. ред. А.И. Мирошников]; Рос. акад. наук, Ин-т биоорган. химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова. М.: Наука, 2004. Т. 1: Генная и белковая инженерия. 2004. 525 с.
3. Тотолян А.А, Чухловин А.Б. Генодиагностика возбудителей инфекционных заболеваний и поиск специфических «генов риска» // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 7. С. 21–36.
4. Чухловин А. Б. Клиническая значимость молекулярно-биологической диагностики // Ученые записки СПбГМУ. 2010. Т. 17. № 1. С. 62–68.
5. Kalendar R, Lee D, Schulman A.H. Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // Genomics. 2011. Vol. 98. No. 2. P. 137–144.

Molecular biological studies in the diagnosis of contagious animal diseases and the control of food and feed safety in the Russian Federation

Belousov V.I.,¹ Varentsova A.A.,¹ Devrishova Z.S., Pantaz Yu.S.²

¹Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory, Moscow, Russia;

²K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia.

Abstract

In the Russian Federation, from 110 to 120 million studies are carried out annually in state veterinary laboratories. By PCR, about 2 million studies are performed annually. The federal subject veterinary laboratories account for 0.97%, and the Rosselkhoznadzor institutions account for 2% of PCR tests.

At the same time, the genomes of the causative agents of 74 names of infectious diseases, including 26 bacterial, 43 viral and 5 protozoal animal diseases, were revealed in biological and pathological materials. Among the bacterial diseases in the biological material, the following genomes were most often identified: *Escherichia coli* (53.5%), pathogens of infectious enterotoxemia in pigs (42.4%), bordetellae (19.4%), mycoplasmas (13%) and

pig streptococci (13%). Among viral diseases, the genomes of feline panleukopenia viruses (63%), rotaviruses (29.4%), coronaviruses (28.0%), Marek's disease (27.1%), chicken infectious bronchitis (23.1%) and circovirus of pigs (22.3%) were more often detected.

In 2018, in the veterinary laboratories of Russia, 9716 samples of feed and feed additives were examined for the presence of GMOs and 31 positive results were obtained (0.3%). The Rosselkhoznadzor institutions during this period investigated 72,544 samples of grain, animal and vegetable feed, compound feed and feed additives, while 3875 positive results were obtained (5.3%). Also, 5388 food samples were investigated, in which GMOs were detected in 467 cases (8.7%). The largest number of GMOs was found in poultry meat (8.9%), prepared meat products (11.3%), fish (15.4%), caviar and milt (19.2%).

Key words: molecular biological studies, PCR, infectious diseases of animals, diagnostics

Новый подход кормления мясных пород кур (*Gallus gallus domesticus*) без применения кормовых антибиотиков

Егоров И.А.,¹ Егорова Т.А.,¹ Ленкова Т.Н.,¹ Манукян В.А.,¹ Иванов И.Н.,^{1,2} Ильина Л.А.,³ Лаптев Г.Ю.³

¹ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Московская обл., Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

³ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург, Россия.

E-mail: dissovet@vnitip.ru

Аннотация

Реализовать генетический потенциал продуктивности можно только у здоровой птицы. В связи с запретом использования кормовых антибиотиков в странах ЕС ведется поиск альтернативы этим препаратам. Такие добавки, как пробиотики, пребиотики, синбиотики, симбиотики, подкислители и фитобиотики, не уступают антибиотикам по эффективности, но исключают негативные последствия. В настоящей работе впервые представлены результаты выращивания молодняка мясных кур исходных линий Б5 и Б9 селекции СГЦ «Смена» с использованием фитобиотика Интебио на основе эфирных масел. Целью работы было изучение влияния этого фитобиотика на рост и половое развитие молодняка кур, активность пищеварительных ферментов и состояние микробиоценоза кишечника в сравнении с кормовым антибиотиком. Для эксперимента отбирали суточных цыплят (две группы по 50 гол. в каждой), которых выращивали до 21-недельного возраста. Контрольная группа получала комбикорма растительного типа с добавкой кормового антибиотика Бацитрацин-30 в течение всего опытного периода. Птица опытной группы получала кормовую добавку Интебио. Установлено, что в опытных группах живая масса петушков и курочек обеих линий в 21-недельном возрасте не различалась с контролем. Развитие репродуктивных органов самцов (семенников) и самок (яичников и яйцеводов) было в пределах нормы и не имело существенных различий между опытными и контрольными группами. Существенных различий по переваримости сухого вещества корма, жира, использования азота корма между птицей контрольных и опытных групп не установлено. Исследования на фистулированной птице показали, что добавка в комбикорма фитобиотика Интебио способствовала повышению активности липазы в

дуоденальном содержимом у молодняка линий Б5 и Б9, а также протеаз в линии Б5. T-RFLP-анализ бактериального сообщества дуоденального содержимого позволил установить присутствие значительного количества филоотипов микроорганизмов, общее число которых в зависимости от линии птицы и введения в рацион фитобиотика составляло 125–170. По результатам оценки таксономической принадлежности большинство выявленных филоотипов было отнесено к филумам *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* (77–96%). В меньшей степени были представлены бактерии филума *Actinobacteria*, в минорном количестве обнаружены представители филумов *Tenericutes* и *Fusobacteria*. В ответ на применение фитобиотика наблюдалось достоверное увеличение представленности членов филума *Bacteroidetes*, а также класса *Clostridiales*, включающего представителей семейств *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, что свидетельствует о повышении потенциала ферментации растительных полисахаридов микробным сообществом.

Ключевые слова: *Gallus gallus domesticus*, молодняк, исходные линии, живая масса, пищеварительные ферменты, фитобиотик, микрофлора кишечника

Введение

Мясная птица может достичь высоких продуктивных и воспроизводительных качеств только при условии полноценного нормированного кормления. От этого в значительной степени зависит результативность работы генетиков и селекционеров. Питательность кормов, их количество и качество должны обеспечить запланированные селекционируемые показатели по неделям жизни, начиная с 7-суточного возраста птицы. На всех этапах выращивания молодняка исходных линий необходимо скармливать комбикорма, сбалансированные по обменной энергии, питательным, минеральным и биологически активным веществам с учетом их доступности. Они должны соответствовать существующим ветеринарно-санитарным и гигиеническим требованиям и быть нетоксичными (1).

В настоящее время большинство стран Европы ввели запрет на включение в корма для птицы кормовых антибиотиков. Основное внимание уделяется кормовым добавкам, которые могли бы заменить кормовые антибиотики без значительных изменений рецептов комбикормов (2–4).

Широкое применение антибиотиков и химических антибактериальных средств нередко приводит к ухудшению здоровья птицы, связанному с развитием неконтролируемых вторичных инфекций — сальмонеллезом, кампилобактериозом, стафилококкозом, клостридиозом, а также полимикробных заболеваний (5, 6). Патогенные микроорганизмы вызывают нарушение состава кишечной микробиоты, приводят к изменению толщины, внешнего

вида, мышечного тонуса, прочности и повышенной парацеллюлярной проницаемости стенок кишечника для токсических метаболитов, что в итоге негативно отражается на состоянии здоровья и продуктивности стада. Актуальным вопросом остается и контаминация продукции птицеводства различными патогенами — возбудителями инфекционных заболеваний человека (7, 8).

Изучение свойств экстрактов и эфирных масел растений считается одним из наиболее перспективных подходов для создания препаратов для профилактики заболеваний и увеличения продуктивности сельскохозяйственной птицы. В отличие от антибиотиков и лекарств, полученных посредством химического синтеза, вещества, выделенные из растений, характеризуются меньшей токсичностью, не аккумулируются в организме и могут стать идеальным сырьем для создания лекарственных препаратов (9). Кроме того, растения представляют собой неограниченный возобновляемый источник биологически активных веществ, включающих до 12 тыс. соединений, из которых описано около 2 тыс. (10). Интерес к ним обусловлен их антибактериальным действием и возможностью применения вместо лечебных и кормовых антибиотиков, а также другими свойствами, влияющими на обмен веществ и продуктивность животных (11–15). Однако данные о многих аспектах воздействия эфирных масел все еще остаются противоречивыми, что может объясняться различием питательного рациона, условий содержания, породными особенностями птицы.

Потребность в племенной продукции для бройлерного производства в стране удовлетворяется в основном за счет зарубежных кроссов птицы. Однако последние годы в СГЦ «Смена» совместно с учеными Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства РАН ведется работа по созданию нового отечественного кросса мясных кур (16, 17). К его основным преимуществам над зарубежными аналогами относятся высокие жизнеспособность и генетический потенциал продуктивности, адаптированность к местным условиям кормления и содержания.

Значительный интерес представляет изучение воздействия фитобиотиков на микробиом кишечника птицы различных генетических линий. Снижение риска развития инфекционных патологий связывают с формированием здоровой микробиоты пищеварительного тракта, которая способна обеспечить высокую резистентность к колонизации кишечника патогенами (18, 19) благодаря синтезу летучих жирных кислот (ЛЖК), бактериоцинов и других соединений, сдерживающих рост и развитие патогенных видов (20, 21). Известно, что микроорганизмы, взаимодействуя между собой, а также с организмом хозяина, способны оказывать глубокое воздействие на иммунитет, неспецифическую резистентность к инфекциям и общие процессы

жизнедеятельности птицы (22). Кроме того, показано активное участие микробного сообщества кишечника птиц в пищеварительных процессах при расщеплении сложных полисахаридов и белков (23, 24), в использовании и образовании питательных веществ, синтезе витаминов (25), развитии ворсинок кишечника, увеличивающих всасываемую поверхность (26, 27).

Наиболее перспективны современные подходы, основанные на применении молекулярно-генетических методов, — NGS-секвенирование (next generation sequencing) и T-RFLP-анализ (terminal restriction fragment length polymorphism) (27–30), при проведении которых отсутствует необходимость в стадии культивирования микроорганизмов.

Целью нашей работы было изучение влияния фитобиотика на основе эфирных масел на рост и половое развитие молодняка мясных кур (*Gallus gallus domesticus*) и состояние микробиоценоза кишечника в сравнении с кормовым антибиотиком.

Материалы и методы

Зоотехнический и физиологический опыты проводили на исходных линиях птицы Б5 (отцовская линия отцовской родительской формы породы корниш) и Б9 (материнская линия материнской родительской формы породы плимутрок) в Селекционно-генетическом центре «Загорское ЭПХ» (Сергиев Посад, Московская обл.) в 2017 году. С суточного до 21-недельного возраста птицу содержали в клетках (по 50 гол. в группе). Влажностный, температурный и световой режимы, фронт кормления и поения соответствовали рекомендациям ВНИТИП (31). Учитывали сохранность и живую массу птицы, а также массу репродуктивных органов (семенников и яичников с яйцеводами).

В первую неделю выращивания молодняк получал корма вволю, без ограничений по количеству. Затем еженедельно выдачу корма фиксировали, то есть осуществляли нормированное кормление. Контрольная группа получала комбикорма растительного типа, сбалансированные по всем питательным веществам соответственно возрастным периодам, с добавкой кормового антибиотика Бацитрацина-30 (активность 42 ед./мг) в количестве 100 г/т в течение всего опытного периода. Птица опытной группы получала кормовую добавку Интебио (ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург) в количестве 1000 г/т корма. Интебио — фитобиотик (ТУ 9362-011-50932298-2011), состоящий из носителя (пшеничные отруби, ГОСТ 7169-66), на который нанесена смесь эфирных масел (чеснока, лимона, чабреца и эвкалипта).

Птицу исходных линий кормили рассыпными комбикормами следующей питательности: 1–21-е сут. — 280 ккал/100 г обменной энергии, 20% сырого протеина, 1,0% кальция, 0,7% фосфора, 1,15% общего лизина, 0,95%

доступного лизина, 0,45% общего метионина, 0,39% доступного метионина; 22–35-е сут. — 275 ккал/100 г, соответственно 18; 1,0; 0,7; 0,9; 0,76; 0,38; 0,32%; 36–105-е сут. — 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%.

Пробы содержимого 12-перстного отдела кишечника для анализа микрофлоры у самок обеих линий опытной и контрольной групп ($n=3$) отбирали в конце эксперимента (по три повторности из каждой группы) со строгим соблюдением стерильности (33) и немедленно замораживали.

Состав микрофлоры исследовали методом T-RFLP. Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора DNA Purification Kit (Fermentas, Inc., Литва), следуя рекомендациям производителя. ДНК-амплификацию проводили на ДНК-амплификаторе Verity (Life Technologies, Inc., США) с использованием эубактериальных праймеров 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') с меткой на 5'-конце (флуорофор D4 — WellRed) и 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3'), которые позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК с позициями от 63 до 1492 (нумерация указана для гена 16S рРНК *Escherichia coli*), в следующем режиме: 3 мин. при 95° (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 гена 16S рРНК очищали по стандартной методике (35). Концентрацию очищенных фрагментов ДНК гена 16S рРНК определяли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, ФРГ). По 30–50 нг ампликонов 16S рРНК обрабатывали рестриктазами *Hae*III, *Hha*I и *Msp*I (Fermentas, Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью секвенатора CEQ 8000 (Beckman Coulter, США) согласно рекомендациям производителя. Принадлежность бактерий к определенной филогенетической группе определяли с использованием программы Fragment Sorter и базы данных (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием компьютерной программы Microsoft Excel, определяя среднее значение (M) и стандартные ошибки средних (\pm SEM). Достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что как опытная, так и в контрольная группы характеризовались 100% сохранностью поголовья. При этом живая масса молодняка изучаемых линий в контрольной и опытной группах была практически идентичной, что свидетельствует о положительном влиянии фитобиотика на рост птицы при сравнении с кормовым антибиотиком (табл. 1).

Таблица 1. Живая масса (г) молодняка мясных кур двух линий и потребление корма (г/гол./сут.) при включении в рацион кормового антибиотика Бацитрацина-30 или фитобиотика на основе эфирных масел Инглебио в зависимости от возраста (М±SEM, СГЦ «Загорское ЭПХ», Сергиев Посад, Московская обл., 2017 г.)

Возраст, нед.	Линия											
	Б5						Б9					
	♂			♀			♂			♀		
	К	О	ПК	К	О	ПК	К	О	ПК	К	О	ПК
1	229±5,4	219±6,2	220±4,8	215±4,3	266	209±3,8	201±5,0	213±2,9	207±4,5	259		
2	340±6,3	335±6,5	332±5,9	327±5,8	294	187±6,0	180±6,5	270±5,6	260±4,8	280		
3	630±8,6	629±8,8	605±7,8	600±6,9	350	527±7,5	521±6,8	492±6,6	489±7,2	336		
4	780±16,3	775±15,8	700±15,2	689±16,0	434	679±12,5	667±13,4	605±10,6	600±11,3	420		
5	938±20,3	940±21,8	807±18,8	800±18,1	469	849±18,6	835±20,1	718±17,7	710±16,5	455		
6	1110±21,6	1115±20,8	980±17,6	982±18,0	476	992±19,3	990±18,4	850±17,0	842±16,8	462		
7	1260±22,3	1262±22,1	1005±118,4	1001±18,6	504	1222±20,3	1215±18,6	1039±16,6	1030±16,8	490		
8	1450±23,6	1440±24,0	1170±20,7	1162±20,1	511	1390±21,4	1382±19,9	1127±18,8	1122±19,2	497		
9	1595±25,2	1589±24,8	1245±23,3	1240±22,9	518	1450±22,6	1455±23,1	1200±20,4	1207±21,1	504		
10	1790±28,3	1794±26,9	1440±27,9	1437±26,8	525	1590±27,6	1587±28,0	1295±25,2	1290±26,4	511		
11	1900±30,2	1910±31,0	1550±28,3	1555±27,8	546	1605±28,8	1600±30,3	1375±25,5	1367±24,8	532		
12	2020±32,3	2015±30,8	1700±26,6	1692±27,0	553	1810±25,6	1812±26,1	1460±24,4	1462±23,7	539		
13	2110±30,6	2117±31,2	1740±27,6	1747±26,5	560	1890±28,0	1884±27,4	1530±22,6	1525±23,1	546		
14	2275±31,2	2269±29,9	1875±28,3	1880±27,6	574	1940±25,6	1932±24,8	1600±20,7	1592±21,4	560		
15	2495±28,8	2490±28,0	1910±26,4	1905±25,9	602	1995±27,7	1990±26,3	1687±24,4	1680±22,6	588		
16	2530±32,4	2537±29,9	1947±27,7	1951±26,8	623	2140±28,5	2147±29,6	1710±26,6	1712±25,7	609		
17	2650±31,7	2649±28,8	2005±30,3	2001±30,0	630	2267±30,1	2260±31,2	1775±28,0	1771±27,8	616		
18	2795±32,5	2790±28,4	2190±29,6	2185±27,7	658	2368±32,5	2351±33,0	1804±26,5	1801±24,7	644		
10	2940±30,8	2947±31,1	2210±29,6	2215±29,1	714	2478±33,4	2480±34,6	1843±30,2	1845±28,8	672		
20	3075±32,6	3077±33,2	2235±28,8	2240±29,0	728	2505±36,2	2500±35,8	1885±27,7	1890±27,0	728		
21	3169±35,0	3172±35,7	2316±30,9	2318±30,7	770	2589±38,8	2590±39,2	1920±29,8	1917±28,7	756		

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

Так, в линии Б5 петушки контрольной группы имели живую массу в конце выращивания 3169 г, опытной группы — 3172 г. У курочек в 21-недельном возрасте наблюдалась та же тенденция. В линии Б9 у петушков обеих групп живая масса также не различалась, хотя по абсолютным значениям она была ниже, чем в линии Б5, что обусловлено направлением селекции этой птицы. Аналогичные результаты были получены по курочкам. Расход корма на 1 голову за весь период выращивания по линии Б5 составил 11,305 кг, по линии Б9 — 10,934 кг. Конверсия корма в опытных группах не имела достоверных различий с контролем по обеим изученным линиям.

Результаты по живой массе птицы при использовании кормового антибиотика и фитобиотика, свидетельствующие о практически одинаковом влиянии изученных препаратов, были подтверждены данными о переваримости и использовании питательных веществ корма. Показатели переваримости сухого вещества, жира, а также использования азота между опытными и контрольными группами как самцов, так и самок не имели значительных различий. Отмечено только, что петушки и курочки линии Б5 лучше переваривали сухое вещество корма на 3,11%, жир — на 2,95 и использовали азот на 2,12%.

Ремонтный молодняк должен иметь не только живую массу, соответствующую нормативам, но и хорошо развитые репродуктивные органы (семенники, яичники и яйцеводы). Масса семенников у 21-недельных петушков линии Б5 в контрольной группе составляла 7,5–9,1 г, в опытной — 7,7–9,3 г, то есть различия были незначительными. В линии Б9 в контрольной группе показатели составляли 7,2–8,7 г, в опытной — 7,4–9,0 г, что практически равнозначно. Аналогичная тенденция прослеживалась и по массе репродуктивных органов самок. Так, в масса яичников с яйцеводом в контрольной группе линии Б5 составила 1,75–1,86 и 5,52–5,61 г, в опытной — 1,74–1,91 и 5,64–5,70 г; для линии Б9 — соответственно 1,73–1,95 и 5,61–5,64 г (контрольная группа), 1,77–1,95 и 5,67–5,72 г (опытная группа).

T-RFLP-анализ бактериального сообщества кишечника позволил установить присутствие значительного количества филотипов микроорганизмов, общее число которых составляло в зависимости от линии птицы и введения в рацион фитобиотика от $125,65 \pm 3,12$ до $170,36 \pm 6,09$ (табл. 2). Часть филотипов, составляющую от $3,98 \pm 0,42$ до $24,88 \pm 1,61\%$ в зависимости от опытной группы, не удалось идентифицировать до уровня филы, что свидетельствует о наличии в содержимом кишечника птицы абсолютно неизвестных микроорганизмов, нуклеотидные последовательности которых не имеют аналогов с описанными таксонами.

Неидентифицированные последовательности были выявлены и на более низких таксономических уровнях.

Таблица 2. Индексы биоразнообразия бактериального сообщества в содержимом 12-перстной кишки у двух линий мясных кур при включении в рацион кормового антибиотика Бацитрацина-30 или фитобиотика на основе эфирных масел Интебио ($M \pm SEM$, СГЦ «Загорское ЭПХ», Сергиев Посад, Московская обл., 2017 г.)

Показатель	Линия Б9		Линия Б9	
	контроль ($n=3$)	опыт ($n=3$)	контроль ($n=3$)	опыт ($n=3$)
Индекс биоразнообразия Шеннона	2,53±0,11	2,43±0,09	3,39±0,15	1,67±0,07
Индекс биоразнообразия Симпсона	0,82±0,04	0,82±0,06	0,91±0,02	0,68±0,08
Число филотипов, ед.	149,05±5,23	130,82±3,68	125,65±3,12	170,36±6,09

Примечание. Описание групп см. в разделе «Материалы и методы»

По результатам оценки таксономической принадлежности большинство выявленных филотипов было отнесено к трем филумам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, суммарная доля которых в дуоденальном содержимом кишечника птиц составляла не менее 77,37±4,29 и максимально достигала 95,69±6,15%. В меньшей степени были представлены бактерии филума *Actinobacteria*, в минорном количестве обнаружены представители филумов *Tenericutes* и *Fusobacteria*.

В бактериальном сообществе кишечника птицы детектировано значительное количество условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, доминирующими среди которых были представители семейства *Campylobacteriaceae*. Этот факт вызывает интерес, поскольку вопрос о присутствии и распространении в химусе 12-перстной кишки возбудителей инфекционных заболеваний изучен слабо.

Отметим, что полученные данные в целом соответствуют современным представлениям о микробиоте кишечника птицы (24, 36–39). Так, по результатам анализа таксономического состава около 5000 последовательностей из баз данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>) и Silva (<https://www.arb-silva.de/>) для сообщества кишечника курицы и индейки установлено присутствие представителей 13 бактериальных филумов, более 90% которых относились к *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* (24).

В целом сравнение экологических индексов между породами птицы выявил более низкие показатели биоразнообразия для линии кур породы плимутрок, что указывает на меньшее накопление энтропии, большую степень организации и однородность состава бактериального сообщества по сравнению с таковым у породы корниш.

Сравнительный анализ бактериального сообщества содержимого 12-перстного отдела кишечника птицы позволил установить статистически значимые различия в составе микробиоты, связанные с применением в рационе птиц фитобиотика. Отмечены некоторые различия в изменении структуры микробиоценоза пищеварительного тракта в зависимости от породы птицы.

Судя по индексам биоразнообразия Шеннона и доминирования Симпсона, у птиц породы корниш фитобиотик способствовал достоверному ($p \leq 0,05$) снижению неоднородности состава микробиоты кишечника.

По результатам таксономической оценки, в бактериальном сообществе 12-перстного отдела кишечника птицы линий обеих линий были отмечены существенные изменения в ответ на применение фитобиотика. Прежде всего, наблюдалось достоверное увеличение представленности членов филума *Bacteroidetes*, а также класса *Clostridiales*, включающего представителей семейств *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о повышении потенциала ферментации растительных полисахаридов микробным сообществом, поскольку перечисленные микроорганизмы обладают способностью гидролизовать крахмал, клетчатку и некоторые другие углеводы, белки и дезаминировать аминокислоты.

Полученные результаты анализа состава микробиоты кишечника вполне закономерны и имеют наглядную взаимосвязь с физиологическим состоянием птиц. Так, увеличение содержания микробиоты, обладающей ферментативной активностью, согласуется с приведенными выше данными о повышении активности панкреатических ферментов в дуоденальном содержимом кишечника.

Наши данные подтверждают сообщения о том, что некоторые облигатные обитатели кишечника птицы способны оказывать непосредственное влияние на продуктивность птицы. Так, Торок с соавт. (37) провели серию экспериментов, в которых обнаружили достоверную корреляцию между составом микроорганизмов в слепых отростках кишечника и эффективностью усвоения кормов. Авторы прежде всего отмечали наличие взаимосвязи для бактерий филума *Firmicutes* (40), включая представителей родов *Eubacterium* (семейство *Eubacteriaceae*), *Roseburia* (семейство *Lachnospiraceae*), *Faecalibacterium* (семейство

Ruminococcaceae) (41). Метаболизм этих микроорганизмов связан с синтезом различных ЛЖК (масляной, уксусной и др.), которые необходимы птице как источник энергии. Некоторые кислоты (например, масляная) увеличивают размер эпителия кишечника (42, 43), обеспечивая тем самым барьер для токсичных агентов (44).

Отметим, что увеличение представленности ЛЖК-синтезирующих микроорганизмов в наших экспериментах при введении в рацион птиц фитобиотика положительно отражалось и на представленности в кишечнике бактерий порядка *Selenomonadales*, которые обладают способностью трансформировать органические кислоты до различных полезных соединений, принимая активное участие в метаболизме.

Кроме того, интересные изменения, связанные с введением в рацион птицы фитобиотика, были отмечены в отношении облигатных представителей кишечника птицы — молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* и бифидобактерий рода *Bifidobacterium*, которые благодаря синтезу ими различных органических кислот и бактериоцинов способны к антагонистическому вытеснению из кишечника патогенов, таких как сальмонеллы, протеи, стафилококки, кишечная палочка, псевдомонады, стрептококки (21, 41). Установлено, что в ответ на применение в рационе фитобиотика у птиц обеих пород достоверно увеличивалась представленность бактерий родов *Bacillus* и *Bifidobacterium* ($p \leq 0,05$) наряду со снижением численности других микроорганизмов, имеющих сходные свойства.

Среди бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, у птиц детектированы возбудители кампилобактериоза (семейства *Campylobacteraceae* — *Arcobacter*, *Campylobacter*), пастереллеза (семейство *Pasteurellaceae* — *Pasteurella*, *Haemophilus*), микоплазмоза (филум *Tenericutes* — *Mycoplasma*), некротического энтерита (филум *Fusobacteria*), гнойно-некротических инфекций (род *Staphylococcus*), клостридии (виды *Clostridium novyi* и *C. perfringens*). Большинство перечисленных микроорганизмов в сообществе кишечника птиц было минорным, за исключением кампилобактерий.

Максимальное содержание условно-патогенных бактерий выявили у птиц породы корниш, что также свидетельствует о некоторой несбалансированности микробного сообщества их кишечника. У кур материнской линии фиксировали меньшее присутствие бактерий родов *Campylobacter*, *Fusobacterium*, а также видов *Clostridium novyi* и *C. perfringens*. Закономерности, характеризующей сходные изменения количества патогенов в дуоденальном содержимом кишечника птицы материнской и отцовской линий в ответ на применение фитобиотика, мы не выявили. Возможно,

это связано с генетическими различиями птицы и требует дополнительных исследований.

Анализируя полученные результаты, у птиц породы корниш следует отметить тенденцию к снижению представленности в дуоденальном содержимом патогенных фузобактерий — возбудителей некротического энтерита с поражением внутренних органов, суставов.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение, что замена кормового антибиотика эфирными маслами растений в комбикормах молодняка мясных кур (исходные линии Б5 и Б9) позволяет получить практически одинаковую живую массу птицы. Развитие репродуктивных органов самцов (семенников) и самок (яичников и яйцеводов) в обеих группах оставалось в пределах нормы без существенных различий. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии у кур обеих пород заметных изменений в бактериальном сообществе дуоденального содержимого, связанных прежде всего с повышением доли представителей микроорганизмов, обладающих ферментативными свойствами в отношении сложных полисахаридов (класс *Clostridia*, филум *Bacteroidetes*), а также бактерий с высокой антагонистической активностью (*Bifidobacterium*, *Bacillus* и др.).

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда 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».

ЛИТЕРАТУРА

1. Фисинин В.И., Егоров И.А., Лаптев Г.Ю., Ленкова Т.Н., Никонов И.Н., Ильина Л.А., Манукян В.А., Грозина А.А., Егорова Т.А., Новикова Н.И., Йылдырым Е.А. Получение продукции птицеводства без антибиотиков с использованием перспективных программ кормления на основе пробиотических препаратов // Вопросы питания. 2017. Т. 86. № 6. С. 114–124.
2. Константинов В. Органические кислоты — отличный результат // Комбикорма. 2010. № 6. С. 115–116.

3. Smith J.A. The future of poultry production in the USA without antibiotics // *Poultry International*. 2002. No. 9. P. 68–69.

4. Фисинин В.И., Околелова Т.М., Просвирякова О.А., Андрианова Е.Н., Крюков О.В., Кузовникова А., Нармонтиене М., Бевзюк В.Н., Папазян Т.Т., Тардагьян А.Г., Щукина С.А., Косинцев Ю.В., Тимофеева Э.Н. Органические кислоты и подкислители в комбикормах для птицы: метод. рекомендации / Под общ. ред. В.И. Фисинина и Т.М. Околеловой; Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т птицеводства. Сергиев Посад, 2008. 28 с.

5. Джавадов Э.Д., Дмитриева М.Е., Трефилов Б.Б., Новикова О.Б., Титова Т.Г. Инфекционная патология в промышленном птицеводстве // *Ветеринария и кормление*. 2016. № 2. С. 24–27.

6. Collier C.T., Hofacre C.L., Payne A.M., Anderson D.B., Kaiser P., Mackie R.I., Gaskins H.R. *Coccidia* induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. Vol. 122. No. 1–2. P. 104–115.

7. Hermans D., Pasmans F., Messens W., Martel A., Van Immerseel F., Rasschaert G., Heyndrickx M., Van Deun K., Haesebrouck F. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* // *Vector-Borne and Zoonotic Disease*. 2012. Vol. 12. No. 2. P. 89–98.

8. Seys S.A., Sampedro F., Hedberg C.W. Assessment of meat and poultry product recalls due to *Salmonella* contamination: product recovery and illness prevention // *Journal of Food Protection*. 2017. Vol. 80. No. 8. P. 1288–1292.

9. Hashemi S.R., Zukifli I., Hair Bejo M., Farida A., Somchit M.N. Acute toxicity study and phytochemical screening of selected herbal aqueous extract in broiler chickens // *International Journal of Pharmacology*. 2008. Vol. 4. No. 5. P. 352–360.

10. Крюков В.С., Глебова И.В. Антибактериальное действие эфирных масел лекарственных растений (обзор) // *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2017. № 3. С. 5–25.

11. Nazzaro F., Frantianni F., De Marino L., Coppala R., De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria // *Pharmaceuticals*. 2013. Vol. 6. No. 12. P. 1451–1474.

12. Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P. Aromatic plants as a source of bioactive compounds // *Agriculture*. 2012. Vol. 2. No. 3. P. 228–243.

13. 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. Vol. 6. No. 1. P. 7–18.

14. Odoemalam V.U., Etuk I.F., Ndelekwute E.K., Iwuji T.C., Ekwe Ch.C. Herbs and spices: option for sustainable animal production // *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2013. Vol. 3. No. 7. P. 116–124.
15. Costa L.B., Luciano F.B., Miyada V.S., Gois F.D. Herbal extracts and organic acids as natural feed additives in pig diets // *South African Journal of Animal Science*. 2013. Vol. 43. No. 2. P. 181–193.
16. Егорова А.В. Мясные куры родительского стада: оценка, отбор и подбор птицы // *Птицеводство*. 2012. № 12. С. 8–10.
17. Егорова А.В., Тучемский Л.И., Емануйлова Ж.В. Продуктивность родительских форм мясных кур селекции селекционного-генетического центра «Смена» // *Зоотехния*. 2015. № 6. С. 2–4.
18. Yeoman C.J., Chia N., Jeraldo P., Sipos M., Goldenfeld N.D., White B.A. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract // *Animal Health Research Reviews*. 2012. Vol. 13. No. 1. P. 89–99.
19. Kerr A.K., Farrar A.M., Waddell L.A., Wilkins W., Wilhelm B.J., Bucher O., Wills R.W., Bailey R.H., Varga C., McEwe S.A., Rajić A. A systematic review-meta-analysis and meta-regression on the effect of selected competitive exclusion products on *Salmonella* spp. prevalence and concentration in broiler chickens // *Preventive Veterinary Medicine*. 2013. Vol. 111. No. 1–2. P. 112–125.
20. Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? // *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78. No. 1. P. 1–6.
21. Messaoudi S., Kergourlay G., Dalgalarondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prévost H., Pilet M.F., Chobert J.M., Manai M., Dousset X. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51 // *Food Microbiology*. 2012. Vol. 32. No. 1. P. 129–134.
22. Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C.M., Finlay B.B. Gut microbiota in health and disease // *Physiological Reviews*. 2010. Vol. 90. No. 3. P. 859–904.
23. Sun H., Tang J.W., Fang C.L., Yao X.H., Wu Y.F., Wang X., Feng J. Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal // *Poultry Science*. 2013. Vol. 92. No. 2. P. 392–401.
24. Wei S., Morrison M., Yu Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome // *Poultry Science*. 2013. Vol. 92. No. 3. P. 671–683.
25. Stanley D., Geier M.S., Denman S.E., Haring V.R., Crowley T.M., Hughes R.J., Moore R.J. Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences // *BMC Microbiology*. 2015. Vol. 15. No. 1. P. 388.

26. LeBlanc J.G., Milani C., de Giori G.S., Sesma F., van Sinderen D., Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective // *Current Opinion in Biotechnology*. 2013. Vol. 24. No. 2. P. 160–168.

27. Fasina Y.O., Hoerr F.J., McKee S.R., Conner D.E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks // *Avian Diseases*. 2010. Vol. 54. No. 2. P. 841–847.

28. Chae B., Ingale S., Kim J., Kim K., Sen S., Lee S., Khong C., Kim E.K., Kwon I.K. Effect of dietary supplementation of probiotics on performance, caecal microbiology and small intestinal morphology of broiler chickens // *Animal Nutrition and Feed Technology*. 2012. Vol. 12. No. 1. P. 1–12.

29. Liao N., Yin Y., Sun G., Xiang C., Liu D., Yu H.D., Wang X. Colonization and distribution of segmented filamentous bacteria (SFB) in chicken gastrointestinal tract and their relationship with host immunity // *FEMS Microbiology Ecology*. 2012. Vol. 81. No. 2. P. 395–406.

30. Sekelja M., Rud I., Knutsen S.H., Denstadli V., Westereng B., Naes T., Rudi K. Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin // *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78. No. 8. P. 2941–2948.

31. Мери́на-Глузкина В.М. Сравнительная оценка сахарифицирующего и декстринирующего методов при определении активности амилазы крови здоровых и больных острым панкреатитом // *Лабораторное дело*. 1965. № 3. С. 142–146.

32. Батоев Ц.Ж. Фотометрическое определение активности протеолитических ферментов в поджелудочной железе, соке по уменьшению концентрации казеина // *Сб. науч. тр. Бурятского СХИ. Улан-Удэ*, 1971. Т. 25. С. 122–126.

33. Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях / Гос. Комиссия Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам, ВПНО «Союзптицепром», НПО птицеперерабатывающей промышленности «Комплекс». М., 1990. 96 с.

34. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ. 2-е изд. (эл.). М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.

35. Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Y., Rumsh L.D. Cloning, sequencing, expression, and characterization of thermostability of oligopeptidase B from

Serratia proteamaculans, a novel psychrophilic protease // *Protein Expression and Purification*. 2014. Vol. 93. P. 63–76.

36. Егоров И.А., Манукян В.А., Ленкова Т.Н., Околелова Т.М., Лукашенко В.С., Шевяко 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 / Под общ. ред. В.И. Фисинина; ВНИТИП. Сергиев Посад, 2013.

37. Torok V.A., Hughes R.J., Mikkelsen L.L., Perez-Maldonado R., Balding K., MacAlpine R., Percy N.J., Ophel-Keller K. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiota in broiler chickens across various feeding trials // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77. No. 17. P. 5868–5878.

38. Diaz-Sanchez S., Hanning I., Pendleton S., D'Souza D. Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety // *Poultry Science*. 2013. Vol. 92. No. 2. P. 562–572.

39. Choi J.H., Kim G.B., Cha C.J. Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens // *Poultry Science*. 2014, 93. No. 8. P. 1942–1950.

40. Bjerrum L., Engberg R.M., Leser T.D., Jensen B.B., Finster K., Pedersen K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and cellular-based techniques // *Poultry Science*. 2006, 85. No. 7. P. 1151–1164.

41. Louis P., Young P., Holtrop G., Flint H.J. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene // *Environmental Microbiology*. 2010, 12. No. 2. P. 304–314.

42. Le Blay G., Blottiere H.M., Ferrier L., Le Foli E.C., Bonnet J.P., Galmiche C., Cherbut C. Short-chain fatty acids induce cytoskeletal and extracellular protein modifications associated with modulation of proliferation on primary culture of rat intestinal smooth muscle cells // *Digestive Diseases and Sciences*. 2000. Vol. 45. No. 8. P. 1623–1630.

43. Fukunaga T., Sasaki M., Araki Y., Okamoto T., Yasuoka T., Tsujikawa T., Fujiyama Y., Bamba T. Effects of the soluble fibre pectin on intestinal cell proliferation, fecal short chain fatty acid production and microbial population // *Digestion*. 2003. Vol. 67. No. 1–2. P. 42–49.

44. Niba A.T., Beal J.D., Kudi A.C., Brooks P.H. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds

and fermentable carbohydrates // Tropical Animal Health and Production. 2009. Vol. 41. No. 7. P. 1393–1407.

A new approach to feeding meat breeds of chickens (*Gallus gallus domesticus*) without the use of feed antibiotics

Egorov I.A.,¹ Egorova T.A.,¹ Lenkova T.N.,¹ Manukyan V.A.,¹ Nikonov I.N.,^{1,2} Ilyina L.A.,³ Laptev G.Yu.³

¹ Federal Scientific Centre ‘All-Russian Poultry Research and Technological Institute’ of the Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia;

² K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

³ OOO BIOTROF+, St Petersburg, Russia.

Abstract

The genetic potential of productivity can be realized only in healthy birds. In connection with the ban on the use of feed antibiotics in the EU countries, an alternative is being sought for these drugs. Supplements such as probiotics, prebiotics, synbiotics, symbiotics, acidifiers and phytobiotics are not inferior to antibiotics in terms of effectiveness, but exclude negative consequences. This work presents for the first time the results of growing young meat chickens of the parental lines B5 and B9 of the selection of the SGS Smena using the phytobiotic Intebio based on essential oils. The aim of the work was to study the effect of this phytobiotic on the growth and sexual development of young chickens, the activity of digestive enzymes and the state of intestinal microbiocenosis in comparison with a feed antibiotic. For the experiment, daily chickens were selected (two groups of 50 animals each), which were raised to 21 weeks of age. The control group received plant-type feed with the addition of the feed antibiotic Bacitracin-30 during the entire experimental period. The bird of the experimental group received the feed supplement Intebio. It was established that in the experimental groups the body weight of males and females of both lines at 21 weeks of age did not differ with the control. The development of the reproductive organs of males (testes) and females (ovaries and oviducts) was within normal limits and did not have significant differences between the experimental and control groups. Significant differences in the digestibility of dry matter of feed, fat, and the use of feed nitrogen between the birds of the control and experimental groups have not been established. Studies on fistulized birds showed that the addition

of the phytobiotic Intebio to the mixed feeds increased the lipase activity in the duodenal content in young birds of the B5 and B9 lines, as well as the proteases in the B5 line. T-RFLP analysis of the bacterial community of duodenal contents revealed the presence of a significant number of phylotypes of microorganisms, the total number of which, depending on the line of the birds and the introduction of phytobiotics into the diet, was 125–170. According to the results of taxonomic affiliation assessment, the majority of identified phylotypes were attributed to the phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* (77–96%). The *Actinobacteria* phylum bacteria were represented to a lesser extent; representatives of the phylum *Tenericutes* and *Fusobacteria* were found in a minor amount. In response to the use of phytobiotics, a significant increase in the representation of members of the phylum *Bacteroidetes* as well as the class *Clostridiales* including representatives of the families *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae* and *Lachnospiraceae* was observed, which indicates an increase in the fermentation potential of plant polysaccharides by the microbial community.

Key words: *Gallus gallus domesticus*, young birds, parental lines, body weight, digestive enzymes, phytobiotic, intestinal microflora

Оценка влияния разных кормовых добавок и препаратов на общее микробное число микрофлоры в кишечнике яичных кур

Мотин М.С., Мясникова О.В.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Email: krox1710@gmail.com

Аннотация

В настоящей работе проводили исследования состава микробиома в желудочно-кишечном тракте у кур-несушек методами RT-PCR при использовании добавок к полнорационному комбикорму, в качестве которых использовали пробиотик Enviva® PRO и антибиотик Вирджиниамицин. Из образцов химуса слепых отростков кишечника птиц выделяли кДНК и определяли общее микробное число. Проведенный предварительный анализ содержимого слепых отростков показал, что введение в рацион птиц указанных кормовых добавок может способствовать изменению общего числа бактерий, однако окончательные выводы будут сделаны после завершения обследования всех опытных образцов.

Ключевые слова: куры-несушки, желудочно-кишечный тракт, слепые отростки, микрофлора, микробиота, микробиом, RT-PCR

Введение

В исследованиях, проводимых в Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы при МВА имени К.И. Скрябина [2, 3], поставлена задача оценить влияние таких препаратов, как фитобиотик Интебио®, пробиотик Enviva® PRO, антибиотик Вирджиниамицин и других, на микробиом слепых отростков кишечника у промышленных кур-несушек. Предложенный и апробированный регламент пробоподготовки и тестирования образцов содержимого слепых отростков с помощью qPCR-RT позволяет за короткий срок определить максимально точно и достоверно эффект кормовых добавок в отношении микробиома кишечника [1], что планируется выполнить в ходе дальнейших исследований как с привлечением всех имеющихся образцов, так и с применением NGS-секвенирования.

Цель настоящей работы заключалась в отработке пробоподготовки и метода qPCR-RT для последующего изучения состава, количества и динамики микрофлоры в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) кур-несушек при использовании в качестве кормовых добавок пробиотика Enviva®PRO и антибиотика Вирджиниамицин.

Материалы и методы

Научно-практические опыты № 1 и 2 выполняли на курах-несушках двух промышленных кроссов — «Ломанн коричневый» и «Ломанн белый». Исследование проводилось в продуктивный период. Период скармливания добавок составлял 21 день.

Первый опыт проводился на птице кросса «Ломанн коричневый» в возрасте 36 недель. Куры опытной группы получали пробиотический препарат Enviva® PRO, птица контрольной группы получала стандартный корм для первого периода яйцекладки. Второй опыт проводили на птице кросса «Ломанн белый» в возрасте 49 недель. Птица опытной группы получала антибиотик Вирджиниамицин.

Пробоподготовка, включая методику выделения ДНК из образцов химуса слепых отростков, для обоих опытов была идентична.

Для отбора проб проводили убой кур по истечении срока скармливания добавки. При этом с целью получения полного представления о микробиоме образцы получали от кур, активно поглощавших корм во время опыта. Отбор содержимого слепых отростков кишечника в одноразовые пробирки типа Eppendorf выполняли после вскрытия тушки с соблюдением условий асептики. До транспортировки в лабораторию образцы замораживали при -20°C и перевозку материала осуществляли в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами (с хладагентом) при -18°C .

ДНК из химуса для анализов микробиома выделяли при помощи набора QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen) [5]. Для очистки образца от липидов, белков и других ненужных веществ в пробирку Dry Bead Tube помещали $\sim 0,1$ г образца, после чего добавляли 750 мкл PowerBread Solution, 60 мкл раствора С1 и ингибировали при 65°C в течение 10 мин. (Гном, Россия). Для преципитации образца его центрифугировали при 13000 g в течение 1 мин. 30 с. После этого отделяли супернатант пипетированием в новую 2-миллилитровую пробирку (400–500 мкл). Затем добавляли 250 мкл раствора С2, хорошо перемешивали на вортексе и ингибировали при $2-8^{\circ}\text{C}$ от 5 до 10 мин. Еще раз центрифугировали до выпадения осадка при тех же параметрах и переносили ~ 600 мкл супернатанта в новую 2-миллилитровую пробирку. Далее добавляли 200 мкл раствора

С3, перемешивали и инкубировали при 2–8°C от 5 до 10 мин., после чего центрифугировали при 13000 g в течение 1 мин., избегая осадка. Отделяли супернатант в отдельную пробирку (не больше 700 мкл) и добавляли 1200 мкл раствора С4, перемешивали. ДНК адсорбировалась на фильтре спин-колонки MB Spin Column, в верхнюю часть этой пробирки добавляли 650 мкл и центрифугировали, после чего сливали из нижней части пробирки жидкость. Этот процесс повторяли пока пробирка с образцом (700 мкл образца + 1200 мкл С4) не опустеет, прогнав раствор примерно 3–4 раза через фильтр в спин-колонке. Затем в спин-колонку добавляли 500 мкл раствора С5 и центрифугировали в течение 1 мин. при 13000 g два раза. После этого перемещали спин-колонку в новую 2-миллилитровую пробирку с крышкой, добавляли 100 мкл раствора С6, центрифугировали при 13000 g в течение 1 мин. и получали конечный препарат ДНК [5]. Качество препарата ДНК оценивали с применением электрофореза в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидиума (3–5 мкл) в камере Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) с ТАЕ-буфером (Thermo Fisher) и использованием маркера молекулярной массы — бромфенолового синего для ДНК (Thermo Fisher), смешанного с образцом в соотношении 1:1 (5 мкл образца к 5 мкл красителя), в режиме постоянного электрического тока напряжением 220 В и в течение 25 мин. Гель с образцами ДНК просматривали на трансиллюминаторе. Кроме того, определяли количество полученной ДНК на аппарате Qubit 3.0.

Анализ с помощью qPCR-RT выполняли согласно существующей методике [2–4]. При этом метод был адаптирован в условиях лаборатории при МВА имени К.И. Скрябина и соответствующим образом апробирован.

При проведении qPCR-RT использовали флуоресцентный краситель SYBR Green (Диаэм, Евроген, Россия). Реакцию проводили на амплификаторах LightCycler® 96 System и LightCycler® 460 System (Roche, Швейцария) в следующем режиме. Все растворы после размораживания тщательно перемешивали. Из расчета на одну пробирку суммарный объем 25 мкл для каждой пробы с учетом ДНК-матрицы готовили при комнатной температуре стоковую реакционную смесь из следующих компонентов: смесь Maxima™ SYBR Green / ROX Mix (2X) — 12,5 мкл, прямой праймер — 0,3 мкМ, обратный праймер — 0,3 мкМ, вода без нуклеаз — до 25 мкл с учетом объема ДНК-матрицы (которую добавляли позже). Реакционную смесь тщательно перемешали, отбирали аликвоты и помещали в ПЦР-плашки. ДНК-матрицу добавляли в ячейку плашки, содержащую смесь для ПЦР [2–4]. Реакцию qPCR-RT осуществляли согласно температурному режиму, представленному в табл. 1.

В режиме реального времени система высчитывала общее микробное число по заданной формуле и через эквивалент *E. coli* методом прямого сравнения. Математическую обработку результатов выполняли в программе MS Excel.

Таблица 1. Температурные условия ПЦР (qPCR-RT)

Шаг	Температура, °С	Время	Количество циклов
«Горячий» старт	95	10 мин.	1
Денатурация	95	15 с	40
Отжиг праймеров	50–60	30 с	
Элонгация	72	30 с	

Примечание: данные по температурному режиму и циклам примерные (зависят от методики и оборудования).

Результаты и обсуждение

В ходе текущих и не завершённых на данный момент двух экспериментов по определению количественного содержания бактерий в слепых отрезках кишечника кур-несушек получены нижеследующие предварительные результаты (табл. 2 и 3).

Таблица 2. Показатели общего микробного числа в контрольной и опытной группах кур-несушек в опыте № 1 (на птицефабрике «Боровская»)

№ курицы	Общее микробное число	№ курицы	Общее микробное число
Контроль		Группа, получавшая пробиотик Enviva® PRO	
1К	2,416×10 ⁶	1О	4,123×10 ⁶
2К	1,916×10 ⁶	2О	1,966×10 ⁶
3К	3,249×10 ⁶	3О	2,627×10 ⁶
4К	3,533×10 ⁶	4О	5,747×10 ⁵
5К	3,086×10 ⁶	5О	1,559×10 ⁶
Среднее	(2,84±0,30)×10⁶	Среднее	(2,17±0,59)×10⁶

Примечание: различие между средними значениями в контроле и опыте недостоверно ($p > 0,05$).

Таблица 3. Показатели общего микробного числа в контрольной и опытных группах кур-несушек в опыте № 2

№ курицы	Общее микробное число	№ курицы	Общее микробное число
Антибиотик Вирджиномицин		Чистый контроль	
1	$5,180 \times 10^6$	1	$4,785 \times 10^7$
2	$7,150 \times 10^6$	2	$3,475 \times 10^7$
3	$7,695 \times 10^6$	3	$3,328 \times 10^7$
4	$5,975 \times 10^6$	4	$1,319 \times 10^7$
5	$6,316 \times 10^6$	5	$3,362 \times 10^7$
Среднее	$(6,463 \pm 0,441) \times 10^{6*}$	Среднее	$(3,254 \pm 0,555) \times 10^{7*}$

* Различие между средними значениями в опыте и контроле достоверно ($p < 0,01$).

Опыт № 1. На птице первого промышленного кросса, содержащейся на птицефабрике «Боровская» (Тюменская обл.), проведены предварительные исследования содержания слепых отростков у кур опытной (при скормливании пробиотика Enviva® PRO) и контрольной групп на предмет выявления общего микробного числа путем проведения количественной ПЦР с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green. Результаты этого опыта приведены в табл. 2 и свидетельствуют о более низком (на 23,6%) среднем значении общего микробного числа в опытной группе, которой скормливали пробиотик Enviva® PRO, по сравнению с контролем, однако различия между группами были недостоверны.

Опыт № 2. В данном предварительном эксперименте изучали воздействие антибиотика Вирджиномицин на общее микробное число. Опыт проводили на курах второго промышленного кросса, которым в течение длительного времени скормливали антибиотик. Результаты оценки общего микробного числа в этом опыте представлены в табл. 3 и показывают, что среднее общее микробное число у птицы опытной группы, получавшей антибиотик Вирджиномицин, было достоверно снижено. Таким образом, мы можем констатировать, что общее микробное число значительно уменьшилось от воздействия антибиотика Вирджиномицин и что ЖКТ кур после применения антибиотика Вирджиномицин населяет почти в 5 раз меньше микроорганизмов ($p < 0,01$).

Заключение

Отработана и освоена методика получения образцов содержимого слепых отростков кишечника у кур, выделения общей бактериальной ДНК и проведения qPCR-RT.

Использование в предварительном эксперименте № 1 пробиотика Enviva® PRO привело у кур опытной группы к незначительному уменьшению среднего содержания бактерий в кишечнике по сравнению с птицей из контрольной группы, однако достоверные различия между группами отсутствовали.

В предварительном эксперименте № 2 общее микробное число в опытной группе с применением антибиотика Вирджиниамицин значительно уменьшилось в сравнении с контролем. Тем самым подтверждено, что использование антибиотиков вызывает подавление микрофлоры, однако в дальнейших экспериментах планируется оценить применение фитобиотиков в качестве более мягкого антимикробного препарата и профилактической меры для промышленного птицеводства.

Исследование выполнено при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Грозина А.А. Состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят-бройлеров при воздействии пробиотика и антибиотика (по данным T-RFLP-RT-PCR) // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 6. С. 46–58.
2. Кочиш И.И., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Смоленский В.И., Сурай П.Ф. Кормовые и ветеринарные аспекты состояния микробиоты кишечника кур-несушек. М.: Сельскохозяйственные технологии, 2017. 182 с.
3. Методические рекомендации по внедрению разработанной системы профилактики бактерий-патогенов путем коррекции рационов питания у кур несушек и применения антимикробных добавок / Кочиш И.И., Смоленский В.И., Лаптев Г.Ю., Романов М.Н., Никонов И.Н., Панин А.Н., Сурай П.Ф., Ильина Л.А., Мясникова О.В., Селина М.В., Коренюга М.В., Колесникова Р.Р., Шихбабаев Э.У.; Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина. М.: МВА им. К. И. Скрябина, 2018.

4. Amit-Romach E., Sklan D., Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers // Poultry Science. 2004. Vol. 83. No. 7. P. 1093–1098.

5. QIAamp® PowerFecal® DNA Kit Handbook: For the isolation of DNA from stool, gut material and biosolids. QIAGEN, August 2017.

Assessment of the effect of various feed additives and preparations on the total microbial number of microflora in the intestines of egg chickens

Motin M.S., Myasnikova O.V.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

In this study, we explored the composition of the microbiome in the gastrointestinal tract in laying hens using RT-PCR method and additives to supplement feed including the probiotic Enviva® PRO and the antibiotic Virginiamycin. cDNA was isolated from samples of the chyme of the chicken cecum and the total microbial number was determined. A preliminary analysis of the cecal contents showed that the introduction of these feed additives into the diet of birds could contribute to a change in the total number of bacteria; however, the final conclusions will be made after the completion of the examination of all experimental samples.

Key words: laying hens, gastrointestinal tract, cecum, microflora, microbiota, microbiome, RT-PCR

Разработка перспективного сорбента микотоксинов для птицеводства на основе отсевов шунгитовой породы

Кочиш И.И.,¹ Егоров И.А.,² Никонов И.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

²ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Московская обл., Россия.

E-mail: ilnikonov@yandex.ru

Аннотация

Поиск новых материалов для сорбции микотоксинов актуален в настоящее время. Цель исследования — тестирование переработанного шунгита в качестве основы кормовой добавки-нейтрализатора микотоксинов для нужд птицеводства. На основе измельченных с помощью вибрационных технологий отсевов шунгита была наработана опытная партия кормовой добавки Мустала® разного фракционного состава. Были проведены исследования по тестированию кормовой добавки Мустала® на основе измельченного шунгита в условиях птицеводства на бройлерах кросса «Кобб 500». Было показано, что профилактическое применение минеральной добавки Мустала® позволяет нивелировать отрицательное воздействие микотоксинов на организм бройлеров и сохранить на расчетном уровне их продуктивность. Кормовая добавка Мустала® проверена на отсутствие связывающей способности по отношению к витаминам, микроэлементам и аминокислотам в ходе проведения балансовых опытов.

Таким образом, кормовая добавка Мустала® при использовании в кормлении птицы, повышает продуктивность, обладает потенциалом к улучшению конверсии корма, практически не влияет на метаболизм витаминов, аминокислот и микроэлементов, и является эффективным сорбентом микотоксинов, при этом ключевым моментом ее подготовки к использованию является применение вибрационных технологий.

Ключевые слова: шунгит, кормовые добавки, бройлеры, микотоксины, птицеводство

Введение

Современные кроссы сельскохозяйственной птицы отличаются высокими показателями продуктивности. Основная задача технологического процесса выращивания кур — максимально полная реализация генетического потенциала кросса с целью получения максимального выхода продукции птицеводства (мяса и яиц) с единицы площади птичника при минимальных затратах.

Одним из факторов, негативно влияющих на продуктивность птицы, является стресс [1]. Стресс может быть вызван кормами, загрязненными микотоксинами — вторичными метаболитами плесневых грибов (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* и др.).

В настоящее время известно свыше 400 видов микотоксинов, продуцируемых различными видами грибов. Микотоксины выявляют как в различных сельскохозяйственных культурах на разных технологических стадиях выращивания в поле, так и при хранении, на стадии переработки зерновых в корма.

По данным фитосанитарного мониторинга, в России комплексом токсигенных (продуцирующих микотоксины) грибов заражено более 60% исследованных товарных партий злаковых культур, поступающих на реализацию или заложенных на хранение [2]. Значительная часть партий зерна загрязнена микотоксинами.

Контаминация сельскохозяйственных культур микотоксинами в поле и партий зерна при хранении диагностируется в разных регионах России. Микотоксины часто выявляют в кормах в количестве от 2–3 видов. Известно, что микотоксины могут действовать в синергизме друг с другом [3], оказывая токсическое действие в концентрациях, меньших, чем ПДК для каждого из микотоксинов в отдельности.

Основным источником микотоксинов для птицы являются зерновые (пшеница, кукуруза, ячмень и др.). Птицефабрики в России используют зерно как собственного производства, так и привозное. Лаборатории по контролю качества на комбикормовых заводах и ветлаборатории диагностируют только шесть видов микотоксинов. Методы контроля в лабораториях основаны на различных модификациях иммуноферментного анализа. Более точные (и более сложные) методы анализа, позволяющие выявлять от нескольких десятков до нескольких сотен микотоксинов на основе хроматографии и масс-спектрометрии, бройлерным птицефабрикам практически не доступны. От отбора проб до получения анализа может уходить до месяца и больше. Данные по содержанию микотоксинов могут поступить в птицеводства, когда партия зерна уже скормлена, поскольку циклы выращивания бройлеров составляют не более 35–44 суток.

Можно сформулировать несколько потенциальных угроз, исходящих от микотоксинов для выращивания сельскохозяйственной птицы:

- высокая вероятность контаминации зерновых микотоксинами;
- отсутствие нормативов по ПДК (МДУ) для большинства микотоксинов;
- синергизм действия микотоксинов, выявляемых в кормах в концентрациях, меньших чем ПДК (МДУ).

Одним из решений для профилактики микотоксикозов у бройлеров является применение специализированных кормовых добавок, таких как сорбенты (адсорбенты) микотоксинов.

Поиск новых материалов для сорбции микотоксинов актуален в настоящее время. Из горных пород сырьем для производства сорбентов токсинов являются: бентониты, монтмориллониты, цеолиты, сепиолиты, клиноптилолиты, каолины, диатомиты, трепела. Однако многие минералы, прежде всего, содержащие алюмосиликаты, обладают рядом недостатков, таких как:

- связывание и вывод из организма птицы полезных компонентов корма (витамины, аминокислоты, микроэлементы и др.);
- относительно высокое содержание тяжелых металлов и токсичных элементов.

В этой связи несомненный интерес представляет шунгитовая порода.

Шунгитовая порода — древнее докембрийское углеродистое образование со специфической структурой и свойствами. Входящий в состав пород шунгитовый углерод обладает фуллереноподобной структурой, характеризуется высокой химической и физико-химической активностью. Установлено, что фуллерен является самым мощным и длительно действующим антиоксидантом. Благодаря этому созданные на основе фуллерена препараты помогают лечить самые разнообразные воспалительные, вирусные, аллергические и другие заболевания: астму, грипп, бесплодие, ожоги, язвы, которые часто трудно поддаются стандартной терапии.

Шунгитовые препараты ускоряют обновление клеток и эпителизацию, обогащают клетки необходимыми питательными элементами, стимулируют циркуляцию крови и регенерацию клеток кожи, обладают бактерицидным и антисептическим эффектом, снимают зуд, оказывают обезболивающее действие.

Эти свойства открывают новые возможности для использования шунгита и в медицинской практике [4].

Шунгит как сорбент характеризуется рядом положительных характеристик:

- высокой механической прочностью и малой истираемостью;
- высокой фильтрующей способностью (т.е. имеет малое сопротивление напору);
- низким содержанием алюмосиликатов и тяжелых металлов;
- способностью к сорбции многих веществ как органических (нефтепродуктов, бензола, фенола, пестицидов и др.), так и минеральных (например, мышьяк).

Цель настоящего исследования — тестирование переработанного шунгита в качестве основы кормовой добавки-нейтрализатора микотоксинов для нужд птицеводства.

Материалы и методы

На основе измельченных с помощью вибрационных технологий отсеков шунгита была наработана опытная партия кормовой добавки Мустала® разного фракционного состава.

Химический состав минеральной добавки Мустала® на основе шунгита, представлен в табл. 1, из которой видно, что в целом содержание макро- и микроэлементов хотя и не может полностью обеспечить потребность в лимитируемых элементах питания бройлеров, но является значительным дополнением к рациону питания.

Таблица 1. Химический состав минеральной добавки Мустала® на основе шунгита, % (в пересчете на абсолютно сухое вещество)

Основные компоненты	Содержание, % масс.	Основные микроэлементы	Содержание, % масс.
SiO ₂	54,89	Si	23,07
Zn	0,008	Zn	0,008
Al ₂ O ₃	3,67	Al	6
Fe ₂ O ₃	2,43	Fe	3,5
MnO	<0,02	Mn	0,022
CaO	0,19	Ca	1,2
MgO	1,07	Mg	1,8
Na ₂ O	<0,3	Na	0,25
K ₂ O	1,05	K	1,01
P ₂ O ₅	0,06	P	0,08
SO ₃ сул. / SC	0,72/0,49	S	1,2
C _{общ.}	34,8	C _{общ.}	34,8
Cu	0,0058	Cu	0,0058
Другие компоненты	8–10	Другие микроэлементы	6–8

По литературным данным, шунгит в зависимости от минеральной основы (алюмосиликатной, кремнистой, карбонатной) обладает адсорбционными, поглощающими, высокореакционными, каталитическими и другими свойствами. Главным образом все эти свойства обусловлены сочетанием основных макроэлементов — кремния и фуллереноподобного углерода.

Исследования по тестированию кормовой добавки Мустала® на основе измельченного шунгита были проведены в условиях птицеводства на бройлерах кросса «Кобб 500» в клеточных батареях типа Big Dutchman, по 30 голов в каждой группе, с суточного до 42-дневного возраста выращивания [5].

Нормы посадки, световой, температурный и влажностный режимы, фронт кормления и поения во все возрастные периоды соответствовали рекомендациям [5] и для двух опытов были одинаковыми.

Птица кормилась рассыпными комбикормами с питательностью согласно нормам [5]. В период 1–14 суток скармливали комбикорма марки Стартер, 15–21 суток — комбикорм Гроуер и 22–36 суток — комбикорм Финишер.

Из суточных кондиционных цыплят методом случайной выборки было сформировано 4 группы в кормленческом опыте (табл. 2).

Таблица 2. Схема опыта на цыплятах-бройлерах

Группа	Особенности кормления
1-я контрольная	основной рацион (ОР-1) — комбикорм, сбалансированный по всем питательным веществам в соответствии с методическим руководством по кормлению сельскохозяйственной птицы (2015 г.)
2-я опытная	ОР-1 + 0,2% минеральной добавки Мустала® на основе шунгита в форме крупки с диаметром частиц 1,5±0,5 мм
3-я опытная	ОР-1 + 0,2 % добавки Мустала® в форме порошка с диаметром частиц 10–20 мкм
4-я опытная	до 14 дней ОР-1 + 0,1% добавки Мустала® в форме крупки с диаметром частиц 1,5±0,5мм, после 14 дней ОР-1 + 0,1% добавки Мустала® в форме крупки с диаметром частиц 1,5±0,5 мм и 0,1% шунгитового щебня фракции 3±2 мм взамен гравия

В ходе кормленческого опыта учитывали следующие показатели:

1. Сохранность поголовья путем учета отхода и установление его причин, %.
2. Живая масса бройлеров в возрасте 1, 14, 21 и 42 суток путем индивидуального взвешивания всего поголовья по группам, г. В возрасте 42 суток учёт живой массы проводили по петушкам и курочкам

раздельно, а среднюю живую массу цыплят рассчитывали, как средняя масса петушка плюс средняя масса курочки, и эта сумма разделена на 2. Период от взвешивания до взвешивания соответствует одному периоду и фазе кормления (1–14, 15–21 и 22–42 суток).

3. Среднесуточный прирост живой массы, г.
4. Затраты корма на 1 кг прироста живой массы в конце опыта, кг.
5. Потребление кормов, за весь период выращивания, кг на голову.
6. Переваримость и использование птицей основных питательных веществ комбикорма по результатам физиологического опыта в возрасте 32–38 дней.

Результаты и обсуждения

Основные зоотехнические показатели, полученные на бройлерах в первом опыте представлены в табл. 3.

Из данных табл. 3 видно, что сохранность птицы во всех группах была высокой и находилась на уровне 100%.

Лучшие показатели по живой массе были получены в опытных группах 2 и 4, где цыплята получали добавку Мустала® в виде крупки и шунгитового щебня. Так, живая масса опытных бройлеров в 14- и 21-дневном возрасте составила соответственно 363 и 364; 1134 и 1144 г, а в 42-дневном возрасте — 2244 и 2256 г, что выше контрольных цыплят на 1,7 и 2,0; 1,2 и 2,1; 1,2 и 1,7% соответственно периодам выращивания.

В 42-дневном возрасте живая масса у курочек в опытных группах 2 и 4 была выше на 0,9 и 1,4%, а у петушков — на 1,4–1,9% соответственно контрольной группе.

Скармливание цыплятам комбикормов с добавкой Мустала® в виде крупки и шунгитового щебня способствовало получению среднесуточных приростов молодняка за 42 дня опыта (соответственно 52,37 и 52,66 г), что превышает приросты контрольных бройлеров на 1,2 и 1,7%.

Цыплята-бройлеры, получавшие комбикорма с добавкой Мустала® в виде порошка (группа 3), во все возрастные периоды выращивания имели живую массу на уровне контрольной группы.

При включении добавки Мустала® в виде порошка комбикорма имели тёмный цвет, однако это не повлияло на уровень их потребления. За весь период выращивания бройлеры опытных групп 2, 3 и 4 потребили комбикорма 3,694; 3,714 и 3,716 кг. При этом затраты комбикорма на 1 кг прироста живой массы составили 1,679–1,690 кг и были ниже контрольной группы на 1,17–1,82%.

Таблица 3. Зоотехнические показатели на цыплятах-бройлерах

Показатели	Группа			
	1 к	2	3	4
Посажено голов	30	30	30	30
Сохранность, %	100	100	100	100
Живая масса, в возрасте, г	44,32	44,48	44,46	44,51
1 сутки	$\pm 0,14$	$\pm 0,15$	$\pm 0,17$	$\pm 0,14$
14 сутки	357	363	361	364
	$\pm 4,95$	$\pm 4,46$	$\pm 4,21$	$\pm 4,31$
% к контролю	100	101,7	101,1	102,0
21 дней	1121	1140	1123	1135
	$\pm 19,31$	$\pm 15,64$	$\pm 19,10$	$\pm 19,85$
% к контролю	100	101,7	100,2	101,2
42 сутки, в среднем, г	2218	2256	2230	2244
% к контролю	100	101,7	100,5	101,2
петушки	2371	2417	23,93	2404
	$\pm 34,23$	$\pm 20,80$	$\pm 19,87$	$\pm 20,31$
% к контролю	100	101,9	100,9	101,4
курочки	2065	2094	2067	2084
	$\pm 26,23$	$\pm 25,02$	$\pm 27,86$	$\pm 21,94$
% к контролю	100	101,4	100	100,9
Расход корма на 1 голову за весь период, кг	3,718	3,714	3,694	3,716
% к контролю	100	99,92	99,38	99,97
Расход корма на 1 кг прироста живой массы, кг	1,710	1,679	1,690	1,690
% к контролю	100	98,18	98,83	98,83
Среднесуточный прирост живой массы, г	51,75	52,66	52,04	52,37
% к контролю	100	101,7	100,6	101,2
Масса печени бройлеров, г	57,10	57,3	57,37	58,03
		$\pm 0,07$	$\pm 0,09$	$\pm 0,27$
Убойный выход тушки, %	71,21	71,42	71,22	71,24

При использовании доброкачественных кормов с включением в их состав добавки Мустала® в форме крупки и щебня с диаметром частиц 3 ± 2 мм взамен гравия отмечено повышение зоотехнических показателей выращивания бройлеров. Так, живая масса бройлеров, получавших добавку Мустала® в виде крупки и щебня в возрасте 42-дней превышала птицу контрольной группы на 1,2 и 1,7%, при снижении конверсии корма на 1,75 и 1,17% за счёт улучшения переваримости и использования питательных веществ комбикорма. Убойный выход тушек бройлеров увеличивался на 0,03 и 0,21%.

Профилактическое применение добавки Мустала® позволяет нивелировать отрицательное воздействие микотоксинов на организм бройлеров и сохранить на расчетном уровне их продуктивность.

Кормовая добавка Мустала® проверена на отсутствие связывающей способности по отношению к витаминам, микроэлементам и аминокислотам в ходе проведения балансовых опытов.

Заключение

Таким образом, при использовании в кормлении птицы кормовая добавка Мустала® повышает продуктивность, обладает потенциалом к улучшению конверсии корма, практически не влияет на метаболизм витаминов, аминокислот и микроэлементов и является эффективным сорбентом микотоксинов. При этом ключевым моментом ее подготовки к использованию является применение вибрационных технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фисинин В.И., Сурай П. Иммуитет в современном животноводстве и птицеводстве: от теории к практике иммуномодуляции // Птицеводство. 2013. № 5. С. 4–10.
2. Иванов А.В., Фисинин В.И., Трemasов М.Я., Папуниди К.Х. Микотоксины (в пищевой цепи). М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2012. 136 с.
3. Крюков В.С. Оценка уровня контаминации кормов микотоксинами и эффективности адсорбентов // Проблемы биологии продуктивных животных. 2014. № 3. С.37–50.
4. Пиотровский Л.Б. Очерки о наномедицине. СПб.: Европейский дом, 2013. 204 с.
5. Методика проведения научных и производственных исследований по кормлению сельскохозяйственной птицы. Молекулярно-генетические методы определения микрофлоры кишечника / И.А. Егоров, В.А. Манукян, Т.Н. Ленкова, Т.М. Околелова, В.С. Лукашенко, А.Н. Шевяков, Г.В. Игнатова, Т.В. Егорова, Е.Н. Андрианова, Б.Л. Розанов, М.А. Лысенко, Т.А. Егорова, А.А. Грозина, Г.Ю. Лаптев, И.Н. Никонов, И.Л. Александрова, Л.А. Ильина, Н.И. Новикова; Под общ. ред. В.И. Фисинина; Российская академия сельскохозяйственных наук, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства Россельхозакадемии. Сергиев Посад: Весь Сергиев Посад, 2013. 51 с.

Development of a promising sorbent of mycotoxins for poultry based on shungite rock screenings

Kochish I.I.,¹ Egorov I.A.,² Nikonov I.N.^{1,2}

¹ K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

² All-Russian Poultry Research and Technological Institute, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia.

Abstract

The search for new materials for the sorption of mycotoxins is currently relevant. The purpose of the study was to test processed shungite as the basis of a feed additive and neutralizer of mycotoxins for poultry needs. On the basis of shungite screenings crushed using vibration technology, an experimental batch of Mustala[®] feed additive of various fractional composition was developed. Studies were conducted to test the Mustala[®] feed additive based on crushed shungite in poultry farming on Cobb 500 cross broilers. It was shown that the prophylactic use of the Mustala[®] mineral supplement allows you to neutralize the negative effect of mycotoxins on the broiler organism and maintain their productivity at a calculated level. The Mustala[®] feed additive was tested for lack of binding ability with respect to vitamins, microelements and amino acids during carrying out balance experiments.

Thus, the Mustala[®] feed additive, when used in poultry feeding, increases productivity, has the potential to improve feed conversion, practically does not affect the metabolism of vitamins, amino acids and trace elements, and is an effective sorbent of mycotoxins, while the key to its preparation for use is the use of vibration technology.

Keywords: shungite, feed additives, broilers, mycotoxins, poultry farming

Отбор перспективных лактобацилл, антагонистичных к *Campylobacter jejuni*

Макавчик С.А.,¹ Карпенко Л.Ю.,¹ Кузнецов Ю.Е.,¹ Никонов И.Н.,^{2,3} Бахта А.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

³ ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Московская обл., Россия.

E-mail: groza81@mail.ru

Аннотация

В данной статье отражены результаты исследования по отбору перспективных лактобацилл, антагонистичных к *Campylobacter jejuni* — виду грамотрицательных бактерий, который является наиболее распространенным и более патогенным для человека. Изучение проводится в рамках проекта по научному обоснованию применения новых технологий в кормлении птицы с использованием специальных пробиотических штаммов, обеспечивающих увеличение продуктивности и получение продуктов птицеводства улучшенного качества со свойствами продуктов функционального питания. В ходе исследования были получены штаммы молочнокислых бактерий — *Lactobacillus crispatus* ВКМ В-2727D, *L. gasseri* ВКМ В-2728D, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. plantarum* ATCC 8014 и *L. plantarum* MD ПЕ-2165. Антагонистическую активность исследуемых культур в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий определяли с использованием индикаторных культур — клинических изолятов *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *C. jejuni*, а также штамма *C. jejuni* ATCC 33560. В ходе исследования выявлено, что большинство штаммов бактерий рода *Lactobacillus* обладают высокой антагонистической активностью относительно индикаторных штаммов и наиболее чувствительными к ингибирующему действию лактобактерий были *E. coli*, *C. jejuni*,

S. typhimurium и *P. vulgaris*. Среди отдельных штаммов *L. plantarum* ATCC 8014 проявляет более выраженную антагонистическую активность, чем другие штаммы лактобацилл.

Ключевые слова: лактобактерии, антибиотикорезистентность, антибиотики, бройлеры, антагонизм к *Campylobacter jejuni*, пробиотики, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, кампилобактериоз

Введение

Борьба с зоонозами, передающимися от животных и птицы к человеку, представляет серьезную проблему во всем мире. Особое внимание в США и странах ЕС уделяется кампилобактериозу. Одним из путей его передачи является поступление с продуктами птицеводства, так как на сегодняшний день вероятность инфицирования кур во время их выращивания все еще остается высокой, а куриные яйца часто подвергаются эндогенному и экзогенному заражению при изменении состава скорлупы и снижения защитных компонентов яичного белка.

Следует также отметить, что у цыплят, выращенных в условиях промышленного птицеводства, отсутствует колонизационная резистентность кишечника в отношении *Campylobacter spp.* Одним из способов решения данной задачи является применения новых технологий питания птицы с использованием специальных пробиотических штаммов, обеспечивающих увеличение продуктивности и получение продуктов птицеводства улучшенного качества со свойствами продуктов функционального питания.

Данное исследование посвящено одному из этапов разработки научных основ данной технологии и, в частности, отбору перспективных лактобацилл, антагонистических к *Campylobacter jejuni* — виду граммотрицательных бактерий, который является наиболее распространенным и более патогенным для человека.

Механизм колонизации кишечника птицы и человека клетками *C. jejuni* во многом не изучены. Hendrixson и DiRita (2001) идентифицировали у *C. jejuni* два основных гена docB (Cj0019c) и docA (Cj0020c), обеспечивающих колонизацию кишечника. Многочисленные хемоаттрактанты, имеющиеся в кишечнике, усиливают колонизацию *C. jejuni*. Основным аттрактантом является муцин (Hugdahl et al., 1988).

C. jejuni имеет два основных гена capA и cadF, отвечающих за адгезию бактериальной клетки на эпителии кишечника птицы и человека (Ashgar et al., 2007; Flanagan et al., 2009). В процессе адгезии *C. jejuni*

на поверхности интестинальных клеток птицы также участвует фибронектин-подобный белок А, кодируемый геном *fibrA* (Konkel et al., 2007).

Биологические свойства *C. jejuni*, такие как колонизация и трансдукция сигнала, необходимые для роста бактерий и развития заболевания, могут нарушаться пробиотиками (Mohan, 2015). Поэтому в настоящее время исследования ученых сфокусированы на применении пробиотиков для профилактики и лечения инфекций ЖКТ. В опытах на однодневных цыплятах (Morishita et al., 1997; Willis, Reid, 2008), а также на иммунодефицитных и иммунокомпетентных мышцах (Wagner et al., 2009) было показано, что коктейль пробиотических штаммов ингибировал колонизацию и рост *C. jejuni*. Микроаэрофильная среда кишечника способствует росту и размножению *C. jejuni*. Присутствие пробиотиков ингибирует рост и размножение *C. jejuni*, а также препятствует проникновению патогена в подслизистый слой (Alemka et al., 2010; Aguiar et al., 2013). Было установлено, что экспозиция клеток *C. jejuni* с пробиотиком нарушала подвижность патогена и его способность к колонизации интестинального эпителия в опытах *in vitro* и *in vivo* (Alemka et al., 2010).

Установлено, что бактериоцины, продуцируемые пробиотическими штаммами *L. salivarius* и *Paenibacillus polymyxa*, выполняют функции колонизирующих пептидов, облегчая внедрение и/или доминирование продуцента в уже оккупированной им нише (Stern et al., 2008). Эти пробиотические штаммы проявляли выраженную антагонистическую активность в отношении *C. jejuni in vitro*, однако были малоактивными *in vivo*.

Наряду с подвижностью и адгезией, инвазия является важным этапом в патогенезе кампилобактериоза. Пробиотики способны снижать инвазию за счет своих конкурентных свойств, что было отражено в ряде работ (Parkhill et al., 2000; Ziprin et al., 2001; Hofreuter et al., 2006). Значительный интерес также представляют исследования, в которых изучается коагрегация лактобацилл с *C. jejuni* (Romero, 2014).

Целью данного исследования являлся отбор перспективных лактобацилл, антагонистичных к *C. jejuni*. Дальнейшие исследования позволят определить пробиотические штаммы, наиболее перспективные и эффективные в промышленном птицеводстве для ингибирования роста и стимуляции элиминации *C. jejuni*, являющегося для человека энтеропатогеном, и тем самым повысить качество и безопасность продуктов птицеводства.

Материалы и методы

Для решения поставленной задачи были получены штаммы молочнокислых бактерий. Выращивание штаммов *Lactobacillus crispatus* ВКМ

B-2727D, *L. gasseri* ВКМ B-2728D, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. plantarum* ATCC 8014 и *L. plantarum* MD ПЕ-2165 проводилось на жидких и агаризованных питательных средах MRS при 37°C в течение 24 ч. Для поддержания рабочих культур лактобацилл также применяли стерильное обезжиренное молоко.

Культивирование молочнокислых бактерий проводили при 37°C в микроаэрофильных условиях с использованием эксикатора и газогенерирующую пакетную систему.

Исследование антагонистической активности *in vitro* проводили методом двухслойного агара, методом блоков и методом лунок на широком спектре индикаторных культур. Так как имеются данные о специфичности механизма проявления антагонистической активности лактобацилл к грамотрицательным и грамположительным бактериям, мы использовали тест-штаммы обеих групп бактерий.

Антагонистическую активность исследуемых культур в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий определяли по зоне задержки роста индикаторных штаммов вокруг колоний отдельных штаммов лактобацилл и их консорциума (в мм).

В качестве индикаторных культур использовали приоритетные клинические изоляты, выделенные от птиц с кишечными инфекциями — *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *C. jejuni*, а также штамм *C. jejuni* ATCC 33560.

Результаты и обсуждение

Штаммы лактобацилл, включая *L. plantarum* ATCC 8014, *L. fermentum* ATCC 9338 и *L. reuteri* ATCC 23272, и их консорциум характеризовались следующим образом:

1. Культуральные признаки (рис. 1 и 2). При выращивании в термостате при 37°C в течение 24–48 часов в микроаэрофильных условиях на поверхности агаризованной среды MRS (HiMedia, Индия; pH=6,5) колонии штамма *L. crispatus* ВКМ B-2727D были средние, бледно-белые, круглые, плоские с ровным краем; штамма *L. gasseri* ВКМ B-2728D — мелкие, бледно-белые, круглые, плоские с ровным краем; штамма *L. plantarum* ATCC 8014 — средние, бледно-белые, круглые, плоские с ровным краем; штамма *L. fermentum* ATCC 9338 — мелкие, бледно-белые, круглые, плоские с ровным краем; штамма *L. reuteri* ATCC 23272 — средние, белые, круглые, выпуклые с ровным краем.

2. Морфологические признаки. При выращивании на жидкой среде MRS (HiMedia, Индия; pH=6,5) или молоке при 37°C в течение 24–48 часов клетки штамма *L. fermentum* ATCC 9338 представляют собой средние

палочки размером ~5–6 мкм, образуют короткие цепочки; клетки штамма *L. reuteri* ATCC 23272 представляют собой средние палочки размером ~4–5 мкм, образуют цепочки; клетки штаммов *L. plantarum* представляют короткие



Рис. 1. Пример выращивания *Lactobacillus plantarum* на поверхности агаризованной среды MRS

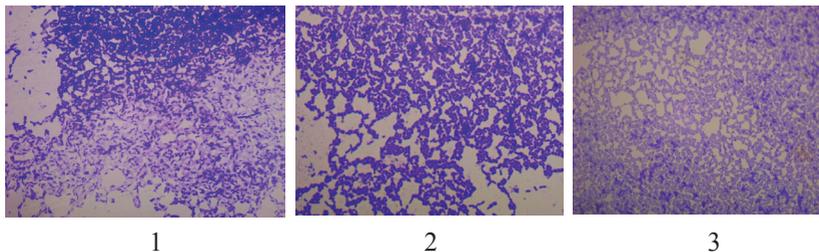


Рис. 2. Результаты микрофотоирования мазков на примере *L. reuteri* (1), *L. plantarum* (2) и *L. fermentum* (3) палочки размером ~3 мкм, образуют короткие цепочки.

3. Физиолого-биологические признаки. Все штаммы являются факультативными анаэробами, температурный оптимум $37 \pm 2^\circ\text{C}$, растут при 42°C , слабый рост при 30°C , оптимальное значение pH среды 5,5–6,0 (рис. 3–5).

4. Антагонистическая активность культур. Антагонизм, как один из основных пробиотических показателей, исследовали у штаммов *L. plantarum*, *L. reuteri* ATCC 23272 и *L. fermentum* ATCC 9338 и их консорциума к клиническим изолятам: *E. coli*, *P. vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *S. typhimurium* и *C. jejuni*. Наиболее чувствительными к ингибирующему действию лактобактерий оказались *E. coli*, *C. jejuni*, *S. typhimurium* и *P. vulgaris*.

Анализ табл. 1 указывает на то, что большинство из отдельных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, и особенно штамм *L. plantarum* ATCC 8014, характеризуются высокой антагонистической активностью в отношении индикаторных штаммов.



Рис. 3. Рост *Campylobacter jejuni* после 72 ч. культивирования



Рис. 4. Рост *Staphylococcus aureus* на среде мясопептонный агар (МПА)

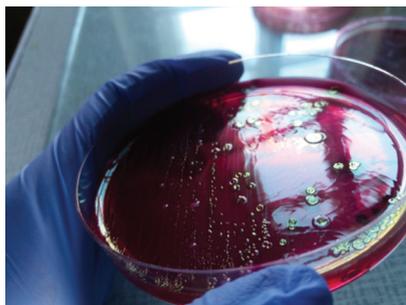


Рис. 5. Рост *Escherichia coli* на среде Эндо

Таблица 1. Антагонистическая активность отдельных штаммов молочнокислых бактерий

Индикаторная культура	Зоны задержки роста индикаторных микроорганизмов для отдельных штаммов лактобацилл и их консорциума, мм (M±m)					
	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	<i>L. crispatus</i> ВКМ В-2727D	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. plantarum</i> MD ПЕ-2165	<i>L. gasseri</i> ВКМ В-2728D
<i>E. coli</i> *	4,4±0,6	3,5±0,3	3,9±0,2	5,4±0,9	1,7±0,2	2,6±0,3
<i>P. vulgaris</i> *	3,8±0,4	3,6±0,3	3,9±0,5	6,2±0,8	0,9±0,1	1,5±0,1
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	7,4±1,8	7,0±0,9	2,9±1,2	8,4±1,8	2,9±1,2	1,4±0,2
<i>C. jejuni</i> *	6,5±0,4	6,0±0,9	5,4±0,8	8,2±1,8	1,4±0,2	2,4±0,5
<i>S. typhimurium</i> *	6,5±0,4	7,3±0,5	5,4±0,8	8,9±1,8	1,8±0,3	2,9±0,3
<i>S. aureus</i> *	4,7±0,3	3,8±0,3	2,9±0,4	6,6±0,7	2,6±0,4	1,6±0,2

*Клинические изоляты, выделенные от птиц при бактериальных кишечных инфекциях

В то же время результаты исследований свидетельствуют о том, что заявляемый консорциум штаммов имеет более выраженную антагонистическую активность, чем отдельные штаммы *L. plantarum*, *L. reuteri* ATCC 23272 и *L. fermentum* ATCC 9338.

Анализ табл. 2 позволяет сделать заключение о том, что изучаемые культуры способны угнетать патогенную микрофлору. Так, 88% лактобактерий ингибируют *E. coli* ($p<0,002$) и 83% подавляют рост *C. jejuni* ($p<0,001$).

Таблица 2. Антагонистическая активность культур молочнокислых бактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Тест-штаммы	Неактивные штаммы	Количество активных штаммов /степень ингибирования		
		высокая	средняя	низкая
<i>E. coli</i>	5	73***	3*	1
<i>S. typhimurium</i>	9	68***	3	4
<i>P. vulgaris</i>	12	62***	5	1
<i>S. aureus</i>	7	64	10	3
<i>C. jejuni</i>	7	70***	6*	1

Различия между тест-штаммами достоверны: * $p<0,05$; *** $p<0,001$

Таким образом, основная масса культур лактобацилл, изучаемых в данном исследовании, обладает антагонистической активностью к ряду патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Результаты исследования показали, что активная кислотность среды влияет на антагонистическую активность исследуемых штаммов лактобацилл по отношению к штаммам тест-культуры *E. coli*. Отмечено, что чем сильнее рН среды смещен в кислую сторону, тем сильнее антагонистический эффект, а чем сильнее смещен рН среды в щелочную сторону, тем слабее антагонистический эффект у исследуемых нами штаммов. Наибольший антагонистический эффект по отношению к клиническим изолятам отмечен при рН=5–6 почти у всех штаммов лактобацилл. Следовательно, активная кислотность среды оказывает сильное влияние на антагонистическую активность штаммов ацидофильной палочки к штаммам кишечной палочки. Самыми устойчивыми при изменении рН среды и сохраняющими антагонизм по отношению к штаммам оказались клинические изоляты *E. coli*.

Заключение

Большинство штаммов бактерий рода *Lactobacillus* обладают высокой антагонистической активностью по отношению к индикаторным штаммам. Наибольшую чувствительность к ингибирующему воздействию лактобактерий проявляли *E. coli*, *C. jejuni*, *S. typhimurium* и *P. vulgaris*. Результаты исследований показали, что из числа отдельных штаммов *L. plantarum* ATCC 8014 проявляет более выраженную антагонистическую активность, чем остальные штаммы лактобацилл.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-76-10017).

ЛИТЕРАТУРА

Aguiar V.F., Donoghue A.M., Arsi K., Reyes-Herrera I., Metcalf J.H., de los Santos F.S., Blore P.J., Donoghue D.J. Targeting motility properties of bacteria in the development of probiotic cultures against *Campylobacter jejuni* in broiler chickens // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2013. Vol. 10. No. 5. P. 435–441.

Alemka A., Clyne M., Shanahan F., Tompkins T., Corcionivoschi N., Bourke B. Probiotic colonization of the adherent mucus layer of HT-29MTXE12 cells attenuates *Campylobacter jejuni* virulence properties // *Infection and Immunity*. 2010. Vol. 78. No. 6. P. 2812–2822.

Ashgar S.S., Oldfield N.J., Wooldridge K.G., Jones M.A., Irving G.J., Turner D.P., Ala'Aldeen D.A. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut // *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 189. No. 5. P. 1856–1865.

Flanagan R.C., Neal-McKinney J.M., Dhillon A.S., Miller W.G., Konkel M.E. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization // *Infection and Immunity*. 2009. Vol. 77. No. 6. P. 2399–2407.

Hendrixson D.R., Akerley B.J., DiRita V.J. Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility // *Molecular Microbiology*. 2001. Vol. 40. No. 1. P. 214–224.

Hofreuter D., Tsai J., Watson R.O., Novik V., Altman B., Benitez M., Clark C., Perbost C., Jarvie T., Du L., Galán J.E. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain // *Infection and Immunity*. 2006. Vol. 74. No. 8. P. 4694–4707.

Hugdahl M.B., Beery J.T., Doyle M.P. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni* // *Infection and Immunity*. 1988. Vol. 56. No. 6. P. 1560–1566.

Konkel M.E., Christensen J.E., Dhillon A.S., Lane A.B., Hare-Sanford R., Schaberg D.M., Larson C.L. *Campylobacter jejuni* strains compete for colonization in broiler chicks // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73. No. 7. P. 2297–2305.

Mohan V. The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015. Vol. 34. No. 8. P. 1503–1513.

Morishita T.Y., Aye P.P., Harr B.S., Cobb C.W., Clifford J.R. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers // *Avian Diseases*. 1997. Vol. 41. No. 4. P. 850–855.

Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H., Whitehead S., Barrell B.G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences // *Nature*. 2000. Vol. 403. No. 6770. P. 665–668.

Romero M. Coaggregation of Lactobacilli with *Campylobacter jejuni* // *i-ACES*. 2014. Vol. 1. No. 1. P. 64–72.

Stern N.J., Eruslanov B.V., Pokhilenko V.D., Kovalev Y.N., Volodina L.L., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Borzenkov V.N., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Stepanshin Y.G., Svetoch E.A. Bacteriocins reduce *Cam-*

pylobacter jejuni colonization while bacteria-producing bacteriocins are ineffective // Microbial Ecology in Health and Disease. 2008. Vol. 20. No. 2. P. 74–79.

Wagner R.D., Johnson S.J., Kurniasih Rubin D. Probiotic bacteria are antagonistic to *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* and influence host lymphocyte responses in human microbiota associated immunodeficient and immunocompetent mice // Molecular Nutrition & Food Research. 2009. Vol. 53. No. 3. P. 377–388.

Willis W.L., Reid L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence // Poultry Science. 2008. Vol. 87. No. 4. P. 606–611.

Ziprin R.L., Young C.R., Byrd J.A., Stanker L.H., Hume M.E., Gray S.A., Kim B.J., Konkel M.E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization // Avian Diseases. 2001. Vol. 45. No. 3. P. 549–557.

Selection of promising lactobacilli antagonistic to *Campylobacter jejuni*

**Makavchik S.A.,¹ Karpenko L.Yu.,¹ Kuznetsov Yu.E.,¹ Nikonov I.N.,²
³ Bakhta A.A.¹**

¹ Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia;

² K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

³ All-Russian Poultry Research and Technological Institute, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia.

Abstract

This article reflects the results of a study on the selection of promising lactobacilli antagonistic to *Campylobacter jejuni*, a species of gram-negative bacteria, which is the most common and more pathogenic for humans. The study is carried out as part of a project on the scientific justification for the use of new technologies in poultry feeding using special probiotic strains that provide increased productivity and improved quality of poultry products with the properties of functional nutrition products. During the study, the following strains of lactic acid bacteria were obtained: *Lactobacillus crispatus* BKM B-2727D, *L. gasseri* BKM B-2728D, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. plantarum* ATCC 8014 and *L. plantarum* MD IIE-

2165. The antagonistic activity of the studied cultures against pathogenic and conditionally pathogenic bacteria was determined using indicator cultures including clinical isolates of *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *C. jejuni* as well as *C. jejuni* strain ATCC 33560. The study revealed that most bacterial strains of the genus *Lactobacillus* have high antagonistic activity against indicator strains and the most sensitive to the inhibitory effect of lactobacilli were *E. coli*, *C. jejuni*, *S. typhimurium* and *P. vulgaris*. Among individual strains, *L. plantarum* ATCC 8014 exhibits more pronounced antagonistic activity than other strains of lactobacilli.

Key words: lactobacilli, antibiotic resistance, antibiotics, broilers, antagonism to *Campylobacter jejuni*, probiotics, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, campylobacteriosis

УДК 636.5.033.087.7

Продуктивность цыплят-бройлеров при включении в выпойку фитогенной кормовой добавки в промышленных условиях

Беломожнов Т.Д., Журавлев М.С.

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А.Тимирязева», Москва, Россия

E-mail: belomozhnovt@mail.ru

Аннотация

Новейшие рекомендации Всемирной организации здравоохранения направлены на сохранение эффективности антибиотических препаратов, необходимых для медицинского применения, путем сокращения их применения у животных. Чрезмерное и не отвечающее основным направлениям действия использование антибиотиков у животных и людей усиливают угрозу резистентности микроорганизмов к антибиотикам. После запрета на использование антибиотических стимуляторов роста в ЕС было исследовано много альтернативных веществ, имеющих схожие свойства, с целью замены антибиотиков при выращивании животных. Активные вещества в составе фитогенных добавок сегодня хорошо известны своими антибиотическими свойствами и широко применяются как в медицине, так и сельском хозяйстве и являются одной из наиболее перспективных альтернатив антибиотических стимуляторов роста. Фитогенные добавки развивают свою первоначальную активность в корме в качестве ароматического сырья и, следовательно, влияют на секрецию пищеварительных соков и общее потребление корма. Стимуляция пищеварительных функций, включая секрецию слюны, пищеварительных ферментов, желчи и слизи, считается одним из важнейших свойств фитогенных добавок. Исследования, направленные на изучение различных растительных субстанций, объектом которых являлись цыплята-бройлеры, показывают четкую тенденцию к улучшению продуктивности и состояния здоровья. Птицефабрики все чаще используют фитогенные добавки в качестве естественного стимулятора роста и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров. AdiCox Sol PF® содержит экстракты *Cinapis alba* L., *Piper nigrum* L., *Acorus calamus* L. и *Saponaria officinalis* L. Применение раствора AdiCox Sol PF® в вы-

пойке цыплят-бройлеров в дозировках 0,5–1,5 литра на 1000 литров воды в течение нескольких периодов увеличило среднесуточный прирост живой массы и сохранность, а также уменьшило потребление и конверсию корма цыплят-бройлеров опытной группы по сравнению с контролем. Включение в выпойку фитогенной добавки было экономически целесообразным и позволило увеличить прибыль от реализации поголовья в опытной группе.

Ключевые слова: фитобиотики, фитогеники, растительные экстракты, природный стимулятор роста, устойчивость микроорганизмов, экономическая эффективность

Введение

Одним из современных путей защиты сельскохозяйственных животных от факторов внешней среды при интенсивном выращивании является применение антибиотических средств, позволяющих улучшать процессы пищеварения и обмена веществ, продуктивность и экологическую безопасность продуктов питания человека путем снижения бактериальной активности в желудочно-кишечном тракте животных. Кормовые антибиотики использовались в терапевтических дозировках для стимулирования роста животных и профилактики заболеваний кишечника в промышленном животноводстве в течение последних пятидесяти лет. Начиная с 90-х годов XX в. было выявлено, что постоянное использование антибиотиков в качестве стимуляторов продуктивности животных способствовало росту резистентности среди патогенных микроорганизмов человека и животных [2, 3, 5].

Одной из возможных альтернатив для замены кормовых антибиотиков являются экстракты, эфирные масла и другие компоненты, произведенные из растительного сырья, обладающие антибиотическими свойствами. Высшие растения выделяют вещества, называемые фитонцидами для защиты собственного организма. Фитонциды являются веществами, эквивалентными по эффективности антибиотикам, произведенными бактериями, грибами и лишайниками, обладающие антибактериальными, противогрибковыми и антипротозойными свойствами. Термин «фитонциды» был предложен Борисом Петровичем Токиным в 1930–1940 годах [4], который одним из первых вел исследования свойств соединений, выделяемых растениями, продолженные в 1980–1990 гг. по настоящее время другими учеными Советского Союза [1], а также Франции, Швейцарии, Великобритании, США и Китая в рамках исследования альтернатив антибиотиков [2, 6].

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования являлось определение целесообразности замены антибиотика в период вакцинации цыплят-бройлеров фитогенной кормовой добавкой в производственных условиях.

Задачами исследования являлись:

- оценка периодичного включения фитогенной кормовой добавки в выпойку на сохранность и продуктивность цыплят-бройлеров;
- оценка экономической эффективности включения фитогенной кормовой добавки при выпойке цыплят-бройлеров.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись суточные цыплята-бройлеры кросса Росс 308 (Ross 308), в выпойку которых начиная с 7-го дня выращивания была включена фитогенная кормовая добавка. Форма фитогенной добавки — жидкость бежевого цвета в форме наноэмульсии с характерным запахом растительных экстрактов, предназначенная для растворения в воде.

Цыплята-бройлеры были распределены на 2 группы — контрольную ($n=178321$), при вакцинации которых единоразово использовался антибиотик Амоксициллин, входящий в стандартную схему вакцинации, и опытную ($n=196781$), где вместо применения антибиотика Амоксициллина проводилась выпойка фитогенной кормовой добавки. Выпойка кормовой добавки проводилась курсами в следующих дозах: 6–10-е сут. — 1,0 л/т воды; 18–22-е сут. — 1,5 л/т воды; 31–35-е сут. — 0,5 л/т воды. Цыплята-бройлеры подопытных групп получали идентичный основной рацион, а система содержания соответствовала нормативным требованиям для кросса Росс 308.

Исследуемая фитогенная кормовая добавка — AdiCox Sol PF[®], состав которой представляет собой концентрированные и стабилизированные экстракты растений: Горчицы белой (*Sinapis alba*), Аира болотного (*Acorus calamus*), Перца черного (*Piper nigrum*), Мыльнянки лекарственной (*Saponaria officinalis*). Действующим веществом изучаемой кормовой добавки являются эфирные масла в концентрации 0,8% и фенольные кислоты в концентрации 0,5%.

Определение живой массы цыплят-бройлеров производилось один раз в 7 суток. Цыплят-бройлеров отбирали методом случайной выборки из разных точек птичника в размере 3% от поголовья птичника и взвешивали на весовой платформе.

Результаты

Прирост живой массы цыплятами-бройлерами опытной группы был интенсивнее в конце периода роста, а на финише и перед убоем средняя живая масса в опытной группе была выше на 100 г, или на 4,6%.

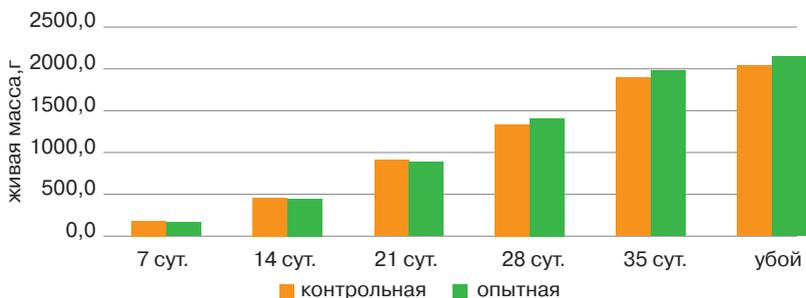


Рис. 1. Живая масса цыплят-бройлеров

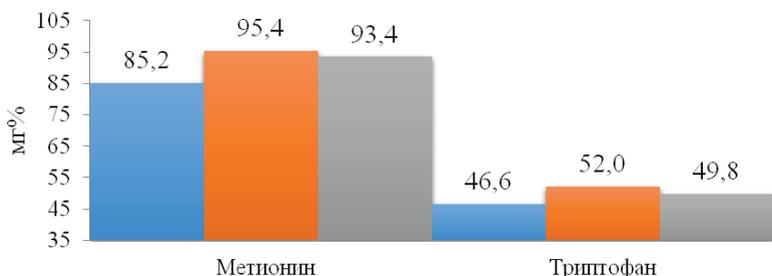


Рис. 2. Динамика среднесуточного прироста живой массы цыплят-бройлеров

Среднесуточный прирост живой массы в опытной группе был выше контроля в конце периода роста, а среднесуточный прирост живой массы за весь период выращивания был выше на 5,2% в опытной группе.

Таблица 1. Показатели продуктивности цыплят-бройлеров

Показатель	Группа		
	контрольная	опытная	разность, %
Живая масса на начало опыта, г	180,3	175,0	-3,0
Конечная живая масса, г	2054	2154	+4,6
Среднесуточный прирост живой массы, г	53,4	56,3	+5,2
Сохранность, %	87,2	94,2	+7,4
Среднесуточное потребление корма, г	101,5	90,1	-11,2
Затраты корма на 1 кг прироста живой массы, кг	1,9	1,6	-15,8
Индекс продуктивности бройлеров	252,0	344,7	+26,9

Сохранность поголовья в опытной группе была выше на 7,4% по сравнению с контролем, потребление корма было ниже в опытной группе на 11,2%, а затраты корма на 1 кг прироста живой массы были ниже на 15,8%. Индекс продуктивности бройлеров отражает влияние показателей продуктивности — средней живой массы, сохранности поголовья, продолжительности выращивания и затрат корма на 1 кг прироста в комплексе. В опытной группе индекс был на 96,7 пунктов выше контроля, что отражает более высокую живую массу и сохранность цыплят-бройлеров опытной группы.

Более высокая живая масса и сохранность на конец выращивания цыплят-бройлеров позволили получить экономический эффект от периодического применения фитогенной кормовой добавки, расчет которого приведен в табл. 2. Расчет условной экономической эффективности использования фитогенной кормовой добавки показал, что при цене реализации 1 кг тушки в 96,36 руб. полученная выручка от реализации условного поголовья с учетом стоимости фитобиотика за весь период выращивания будет выше в опытной группе на 19,5 тыс. руб., или на 10,2%, по сравнению с контролем.

Таблица 2. Экономическая эффективность использования фитогенной кормовой добавки

Показатель	Группа	
	контрольная	опытная
Расчетное поголовье в начале опыта, гол.	1000	1000
Сохранность поголовья, %	87,2	94,2
Расчетное поголовье в конце опыта, гол.	872	942
Средняя живая масса, кг	2,054	2,154
Валовая живая масса поголовья за период опыта, кг	1785	2029,1
Цена реализации 1 кг тушки бройлера, руб.	96,36	96,36
Полученная выручка от реализации цыплят-бройлеров, руб.	172002,6	195524,1
Стоимость AdiCox Sol PF® за период опыта на 1000 гол., руб.	–	4032
Прибыль от реализации цыплят-бройлеров за вычетом стоимости добавки, руб.	172002,6	191492,1
Дополнительная прибыль, руб.	–	19489,5
Дополнительная прибыль, %	–	10,2

Заключение

Результаты опыта показали, что применение раствора фитогенной кормовой добавки в выпойке цыплят-бройлеров в дозировках 0,5–1,5 литра на 1000 литров воды в течение нескольких периодов при замене антибиотика Амоксициллина в схеме вакцинации увеличило среднесуточный прирост живой массы цыплят-бройлеров опытной группы на 5,2% и сохранность на 7,4% по сравнению с контролем. Потребление корма у цыплят-бройлеров опытной группы снизилось на 11,2%, а затраты корма на 1 кг прироста живой массы были ниже на 15,8%, по сравнению с контролем. Включение в выпойку фитогенной добавки было экономически целесообразным и позволило увеличить прибыль от реализации поголовья в опытной группе на 10,2%, что позволяет сделать вывод об экономической эффективности включения фитогенной кормовой добавки в период вакцинации цыплят бройлеров для замены антибиотика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буряков Н. Дары леса // Животноводство. 1995. № 9. С. 19.
2. Буряков, Н.П. Использование кормовой добавки на основе хвои в кормлении коров / Н.П. Буряков, М.А. Бурякова [и др.] // Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения: Материалы национальной научно-практической конференции. М.: МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, 2019. С. 166–168.
3. Буряков Н.П., Бурякова М.А., Заикина А.С., Елифанов В.Г., Косолапова В.Г. Рациональное кормление животных: монография. М.: ФГБОУ ДПО РМЖ, 2017. 191 с.
4. Токин, Б.П. Фитонциды. Directmedia, 2016. 237 с.
5. Domig K.J. Antibiotikaresistenz und der Einsatz von Antibiotika in der Tierernährung // Tagungsband 4. BOKU-Symposium Tierernährung, Tierernährung ohne Antibiotische Leistungsförderer, 27.10.2005, Wien. S. 1–8.
6. Loizzo M.R., Saab A.M., Tundis R., Statti G.A., Menichini F., Lampronti I., Gambari R., Cinatl J., Doerr H.W. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species // Chemistry & Biodiversity. 2008. Vol. 5. No. 3. P. 461–470.

Performance of broiler chickens supplemented with liquid phytogetic feed additive in industrial conditions

Belomozhnov T.D., Zhuravlev M.S.

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Abstract

The latest recommendations of the World Health Organization are aimed at maintaining the effectiveness of the antibiotic drugs needed for medical purpose by reducing their use in animals. Excessive and inappropriate use of antibiotics in animals and humans increases the threat of resistance of microorganisms to antibiotics. After prohibition of use of antibiotic growth stimulants in the EU, many alternative substances with similar properties were investigated in order to replace antibiotics in animal rearing. The active substances in phytogetic additives are now well known for their antibiotic properties and are widely used both in medicine and agriculture. PhytoGENICS are one of the most promising alternatives to antibiotic growth stimulants. Phytogetic additives develop their initial activity in the feed as aromatic raw materials and, therefore, affect the secretion of digestive juices and total feed intake. Stimulation of digestive functions including the secretion of saliva, digestive enzymes, bile and mucus is considered as one of the most important properties of phytogetic additives. Studies aimed at studying various plant substances for using in broiler chickens show a clear tendency to improve productivity and health. Poultry farms are increasingly using phytogetic additives as natural stimulants for the growth and prevention of diseases of the gastrointestinal tract of broiler chickens. AdiCox Sol PF® contains extracts of *Cinapis alba* L., *Piper nigrum* L., *Acorus calamus* L. and *Saponaria officinalis* L. Use of AdiCox Sol PF® solution in the feeding of broiler chickens in doses of 0.5–1.5 liters per 1000 liters of water in the course of several periods increased the average daily gain and production safety as well as reduced the feed intake and conversion of broiler chickens of the experimental group as compared with the control. The administration of phytogetic additives in the water was economically purposeful and allowed to increase profits from the sale of meat in the experimental group.

Key words: phytobiotics, phytoGENICS, plant extract, natural growth stimulator, microorganism resistance, economic efficiency

Использование ферментированного подсолнечникового шрота в рационах бройлеров (на примере АО «Линдовское»)

Галкин А. В.,¹ Воробьева Н. В.,¹ Мясникова О. В.²

¹ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия», Нижний Новгород, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия.

E-mail: root@agri.sci-nnov.ru

Аннотация

В статье рассматриваются варианты включения ферментированного подсолнечникового шрота в рационы цыплят-бройлеров на разных этапах откорма. Анализируется в сравнительном аспекте изменение питательности рационов СТАРТ–РОСТ–ФИНИШ при введении данного компонента в рацион. Приводятся оптимальные дозировки использования продукта в условиях конкретного хозяйства.

Ключевые слова: бройлеры, птицеводство, ферментированный шрот, соя, подсолнечник, протеиновая и аминокислотная питательность

Введение

В условиях экономического кризиса и санкций перед производителями животноводческой продукции остро встает вопрос использования в рационах недорогих компонентов отечественного, а иногда даже и местного производства, так как на долю кормов приходится около 70% всех затрат в себестоимости продукции [4]. В деле обеспечения продовольственной безопасности страны особое значение имеют продукты птицеводства ввиду их доступности по цене, относительной скорости получения и окупаемости вложенных средств. Для обеспечения генетически обусловленной продуктивности птицы современных кроссов необходимы сбалансированные по всем параметрам комбикорма. Наиболее богатыми источниками незаменимых аминокислот являются корма животного происхождения. Учитывая все возрастающие цены на

белки животного происхождения, специалисты по кормлению составляют большинство рационов для птицы преимущественно из белков растительного происхождения. В таких рационах почти всегда не хватает метионина, лизина, треонина, а иногда триптофана и аргинина.

Биологическую ценность рационов птицы повышают путем обогащения синтетическими аминокислотами, что значительно увеличивает их стоимость [2]. Поэтому для предприятий этой отрасли особенно актуальна замена компонентного состава рациона кормления.

Прежде всего встает вопрос уменьшения в рационе доли самых дорогих компонентов, а таковыми, как правило, являются самые ценные в питательном отношении компоненты, такие, как например, соевый шрот [3]. При этом белок соевого шрота является наиболее биологически полноценным из всех растительных белков: так, например, содержание в нем лизина очень высоко и при исключении из рациона соевого шрота придется дополнительно закупать в качестве компонента лизин [1]. Поэтому заменить соевый шрот в рационе птицы крайне сложно.

Наиболее доступным на сегодняшний день является подсолнечниковый шрот, однако ввод его в комбикорм птицы ограничен по массе из-за высоких концентраций клетчатки, лигнина и некрахмалистых полисахаридов.

С подобной проблемой столкнулось и предприятие АО «Линдовское». С целью снижения себестоимости рационов мы предлагаем ввести в рационы на всех этапах (СТАРТ, РОСТ, ФИНИШ) ферментированный подсолнечниковый шрот, заменяя им часть соевого.

Цель исследований — оценить возможность использования ферментированного подсолнечникового шрота в условиях интенсивного птицеводческого производства и определить оптимальные дозировки ввода продукта с прогнозированием экономических результатов его использования.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе АО «Линдовское» с использованием птицы кросса Росс ПМ- 3. В процессе выращивания птицы на фабрике используются рационы СТАРТ (1–10-е сутки), РОСТ (11–24-е сутки) и ФИНИШ (25–38-е сутки откорма). Цыплята поступают на откорм с живой массой 40 г, а в конце периода откорма они достигают массы 2300 г в возрасте 38 суток.

В табл. 1 представлен состав фактических и предлагаемых рационов с использованием ферментированного подсолнечникового шрота на разные периоды откорма.

Таблица 1. Состав предлагаемых и фактических рационов по периодам откорма

Компоненты	Рацион					
	Фактический			Предложенный		
	СТАРТ	РОСТ	ФИНИШ	СТАРТ	РОСТ	ФИНИШ
Пшеница, %	60,70	67,22	72,09	60,14	66,41	71,01
Шрот соевый, %	29,05	18,30	8,00	25,62	14,70	4,70
Шрот подсолнечника, %	1,00	4,00	8,00	0,00	0,00	0,00
Шрот подсолнечника ферментированный, %	0,00	0,00	0,00	5,00	8,00	12,00
Мука мясокостная, %	3,00	4,50	6,00	3,00	4,50	6,00
Масло подсолнечное, %	3,00	2,90	3,10	3,00	3,27	3,40
Известняковая мука, %	0,88	0,43	0,55	0,88	0,43	0,55
Монокальций-фосфат, %	0,49	0,81	0,46	0,49	0,81	0,46
Соль, %	0,28	0,22	0,24	0,27	0,19	0,15
Сульфат натрия, %	0,09	0,02	0,00	0,09	0,02	0,10
Лизин, %	0,00	0,10	0,06	0,00	0,17	0,13
Метионин, %	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Премикс, %	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Цена, руб./т	22,587	20,212	17,884	22,002	19,772	17,322

Результаты и обсуждение

В предложенном стартовом рационе уменьшилось содержание соевого шрота на 3,43%, в состав рациона включено 5,0% ферментированного подсолнечникового шрота, за счет чего снизилась его стоимость на 585 руб./т. В рационе периода РОСТ содержание подсолнечникового шрота увеличилось в 2 раза (до 8,0%) за счет использования ферментированного продукта. При этом ввод соевого шрота снизился на 3,6%, что удешевило рацион на 440 руб./т.

В рационе завершающего периода откорма ввод подсолнечникового шрота увеличен до 12%, а количество соевого шрота снижено на 3,3%. Стоимость рациона уменьшилась на 562 руб./т.

В табл. 2 представлены показатели питательности рационов различных периодов откорма.

Таблица 2. Показатели питательности фактических и предлагаемых рационов по периодам откорма

Питательность	Рацион					
	фактический			предложенный		
	СТАРТ	РОСТ	ФИНИШ	СТАРТ	РОСТ	ФИНИШ
Обменная энергия, ккал/100 г	303,00	308,00	312,00	303,00	308,00	312,00
Сырой протеин, %	23,00	21,00	19,49	23,00	21,01	19,49
Сырой жир, %	5,00	5,28	5,99	5,00	5,67	6,32
Сырая клетчатка, %	3,35	3,55	3,88	3,88	4,11	4,39
Лизин, %	1,51	1,28	1,15	1,46	1,28	1,14
Метионин, %	0,71	0,60	0,56	0,72	0,62	0,58
Метионин + цистин, %	1,05	1,00	0,95	1,07	1,02	0,98
Треонин, %	1,02	0,88	0,81	1,01	0,89	0,80
Триптофан, %	0,30	0,25	0,23	0,29	0,25	0,23
Аргинин, %	1,44	1,28	1,14	1,45	1,29	0,15
Метионин усвояемый, %	0,66	0,56	0,51	0,67	0,56	0,52
Лизин усвояемый, %	1,35	1,15	1,02	1,35	0,15	1,02
Ca, %	0,96	0,86	0,76	0,96	0,86	0,76
P, %	0,79	0,71	0,64	0,79	0,71	0,64
Fe, мг	40,00	55,00	40,00	40,00	55,00	40,00
Cu, мг	50,00	53,00	50,00	50,00	53,00	50,00
Zn, мг	143,67	167,67	155,50	143,67	167,67	155,50
I, мг	1,50	1,80	1,50	1,50	1,80	1,50
Se, мг	0,30	0,39	0,30	0,30	0,39	0,30
Na, %	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Cl, %	0,25	20,23	0,24	0,25	0,23	0,2
Витамин А, тыс. МЕ	15	12	10	15	12	10
Витамин D ₃ , тыс. МЕ	5	4,5	4	5	4,5	4
Витамин Е, мг	100	80	60	100	80	60
Витамин В ₁ , мг	3,5	2,5	2,2	3,5	2,5	2,2
Витамин В ₄ , мг	450	450	450	450	450	450
Витамин В ₁₂ , мг	0,02	0,02	0,015	0,02	0,02	0,015

При сравнении показателей питательности фактического и предложенного рационов можно отметить, что общая питательность сохранена: обменная энергия и сырой протеин остались на прежнем уровне. В предложенных рационах с увеличением ввода подсолнечникового шрота уровень сырой клетчатки возрастает, но незначительно.

Аминокислотный состав соевого шрота значительно богаче, поэтому заменить его подсолнечниковым достаточно сложная задача. Это видим и в качественных показателях. Уровни общего лизина и метионина в фактических рационах оказались выше, чем в предложенных.

Благодаря тому, что подсолнечниковый шрот ферментирован, действие ферментов в рационе учтено, поэтому содержание усвояемых аминокислот сравнялось с фактическим. Уровни содержания компонентов биологически активной части рациона в рационах различных периодов выращивания одинаковы в предлагаемом и фактическом рационах, так как используется один и тот же премикс (1,5%) отечественного производителя (ДСМ, Набережные Челны).

Заключение

В настоящее время кормовые свойства ферментированного шрота и возможности использования его в птицеводстве недостаточно хорошо изучены. Однако уже сейчас можно утверждать, что, применяя такой продукт в рационах бройлеров, мы имеем дело со стабильной по составу белковой кормовой субстанцией с повышенной концентрацией и доступностью незаменимых аминокислот, что дает дополнительную экономию на синтетических аминокислотных добавках.

Введение обогащенного продукта в корм предотвращает бесполезное перемещение оставшихся в шроте частиц лузги подсолнечника по желудочному тракту. В связи с этим появляются дополнительные возможности по повышению переваримости всех питательных веществ рациона снижению затрат корма на единицу продукции и повышению конверсии питательных веществ, а это значительный резерв удешевления кормления.

В нашем исследовании экономический эффект оказался значительным. Для достижения финальной живой массы 2300 г на одного бройлера расходуется 3912 г кормов. При установленной разнице в стоимости рационов экономический эффект в пересчете на 1000 гол. составит 2041 руб. Для предприятия со среднегодовым поголовьем 1 млн цыплят-бройлеров и при 7 оборотах стада в год получаем 14,3 млн руб. прибыли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров И.А., Егорова Т.В. Соевый шрот с разными кислотным и перекисным числами в комбикормах для бройлеров // Птицеводство. 2015. № 12. С. 21–24.

2. Егоров И., Егорова Т., Рошупкин Р., Кудинов С. Высокопротеиновый соевый шрот в комбикормах для цыплят-бройлеров // Комбикорма. 2017. № 7–8. С. 46–48.

3. Романова А.Б., Самарина Е.А., Баурин Д.В. Получение белковых ферментоллизатов шрота подсолнечника // Успехи в химии и химической технологии. 2013. Т. XXVII. № 9 (149). С. 11–14.

4. Методическое руководство по кормлению сельскохозяйственной птицы / Федеральное гос. бюджетное научное учреждение «Всероссийский науч.-исследовательский и технологический ин-т птицеводства» (ФГБНУ ВНИТИП); [разраб.: И. А. Егоров и др.]. Сергиев Посад, Московская обл.: ВНИТИП, 2015. 199 с.

The use of fermented sunflower meal in the diets of broilers (in JSC Lindovskoe)

Galkin A.V.,¹ Vorobyeva N.V.,¹ Myasnikova O.V.²

¹Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, Nizhny Novgorod, Russia;

²K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia.

Abstract

The article discusses options for including fermented sunflower meal in the diets of broilers at different stages of feeding. Analyzed in a comparative aspect, the change in the nutritional value of the diets START–GROWTH–FINISH with the introduction of this component in the diet has been addressed. The optimal dosages of the use of the product in a particular enterprise are given.

Key words: broilers, poultry farming, fermented meal, soy, sunflower, protein and amino acid nutrition

УДК 636.5.084.5.087.7

Оценка и выбор кормовых ферментов

Глебова И.В.,¹ Зиновьев С.В.,² Крюков В.С.³

¹ ФГОУ ВПО «Курская ГСХА», Курск, Россия;

² ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Московская обл., Россия;

³ ООО «ВетФармСтандарт», Москва, Россия.

E-mail: snow1968@inbox.ru; neollit_13@mail.ru

Аннотация

Описаны эндо-1,4-глюканызы и эндо-1,4-ксилаказы. Их активность изучалась *in vitro* в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт домашней птицы. Понижение температуры среды с 50 до 38°C снижало активность всех ферментов. Активность при pH=3 была выше, чем при pH=7. В целом активность ксилаказы была более стабильной, чем активность глюканызы. Обосновано, что указанная производителем активность служит только для маркировки продукта и не отражает его действия в организме. Используемые матричные значения ферментов предназначены для коммерческих целей и слабо отражают реальное действие фермента.

Ключевые слова: кормовые ферменты, активность, матричные значения ферментов

Ферменты, используемые в кормлении животных, первоначально разрабатывали для применения в промышленности, и только в последующем они были предложены в качестве кормовых добавок. Потребность промышленности многократно превышает долю ферментов, используемых в кормопроизводстве. Поэтому производители ферментов вкладывают средства в разработку продуцентов, которые образуют ферменты, в первую очередь, отвечающие требованиям промышленного производства.

Ферментные препараты, создаваемые для промышленных целей, проявляют максимальное действие в условиях, которые далеко не соответствуют среде и температуре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Преимущественное предназначение ферментов для промышленных целей подтверждают методы контроля их активности, которую в большинстве случаев опреде-

ляют при температуре 50–55°C и pH=5,0–5,5. Эти условия соответствуют промышленным технологическим регламентам. В ЖКТ температура будет значительно ниже и среда другая. В ЖКТ присутствуют собственные пищеварительные ферменты, которые переваривают белки и, в том числе, могут переварить добавленные ферменты, которые обладают разной устойчивостью к действию протеаз ЖКТ. Так, в Московском государственном университете при изучении 24 ферментных препаратов, из числа наиболее распространённых на рынке России, установили, что активность эндо-β-1,4-глюканазы и эндо-β-1,4-ксиланазы в среде, имитирующей pH и температуру желудка, оказалась в среднем на 57,3 и 42,8% ниже соответственно против активности, определённой при pH=5 и температуре 50°C. У отдельных препаратов активность глюканазы в условиях желудка была на 75–80% ниже, чем при pH=5 и температуре 50°C (табл. 1). Активность эндо-β-1,4-ксиланазы тех же препаратов в условиях желудка снижалась более интенсивно, чем глюканазы, причём её снижение у ксиланазы не было симбатным по отношению к глюканазе: в отдельных случаях она снижалась более прогрессивно, а в других — наоборот. При выдержке в кислой среде в присутствии пепсина в течение 30 и 120 минут активность ферментов продолжала снижаться, но у большинства препаратов в меньшей степени, чем первоначально под влиянием более низкой температуры (Волчок и др., 2018). Было ли это обусловлено перевариванием ферментов под влиянием пепсина или вызвано денатурацией их белка в кислой среде, осталось неясным. Интересно отметить, что активность изученных ферментов при pH=7, которая близка среде кишечника, оказалась существенно ниже, чем в кислой среде желудка. Последнему следует дать негативную оценку, так как большую часть времени кормовые массы находятся в кишечнике, где подвергаются перевариванию.

В последние годы специалисты заостряют внимание на том, что активность ферментов и их действие отражают разные понятия. Указывают, что единицы, характеризующие активность, предусмотрены для целей маркировки коммерческих препаратов и не имеют ценности для сравнения их свойств (Vasquez, Glitsoe, 2012). Создаёт путаницу выражение активности единицами, имеющими разную размерность. Так, для выражения активности ксиланазы используют 9 различных единиц (Волчок и др., 2018). Активность фермента, указанная производителем, характеризует способность производить определённое действие в конкретных условиях анализа, которые отличаются у разных производителей и тем более от условий, складывающихся в организме, поэтому активность, установленная производителем, не совпадает с её проявлением в ЖКТ и не является надёжным способом для выявления сравнительной эффективности кормовых ферментов (Vasquez, Glitsoe, 2012).

Таблица 1. Активность ферментов при pH=5 и температуре 50°C, и в условиях, имитирующих температуру и pH желудка и кишечника (Волчок и др., 2018)

Ферментный препарат	Производитель	Активность при 50°C, pH=5, ед.		Активность при 38°C, в % от определённой при 50°C, pH=5, ед.			
		Глюканаза	Ксиланаза	Глюканаза		Ксиланаза	
				pH=3	pH=7	pH=3	pH=7
Фекорд-2004-С	ТД «Фермент», Беларусь	80	290	90	33	81	47
Атроцелл Плюс	Агрофермент, Россия	4100	1050	56	32	80	42
Актра ХВ 201 ТРТ	Du Pont, США	1300	780	62	11	62	45
Эюназа ХТ 25	АВ Елзутес, Германия	65	2100	63	13	54	47
Агроксил Плюс	Агрофермент, Россия	1100	4100	60	35	54	32
Агроксил Премиум	Агрофермент, Россия	3200	2700	56	36	54	42
Вилзим	Елпех, Мексика	2180	11000	58	12	52	28
Атроцелл	Агрофермент, Россия	4200	1040	40	25	70	45
Ровабио Макс AP	Adisseo, Франция	1480	2720	23	4	70	8
Ксилбеген-Целл	Блювет-Фермент, Болгария	4000	610	25	5	67	0
Актра ХАР 101 ТРТ	DuPont, США	—	1800	—	—	67	52
Эндюфид	Andres Pinitaluba, S.A., Испания	580	1000	31	6	65	26
Целлолаза	ALBE, Liaoning Baijia Biotechnology Co, Китай	5870	500	39	31	62	5
Целлолюкс F	Сиббиофарм, Россия	3500	1440	23	31	61	7
Агроксил	Агрофермент, Россия	1100	5100	44	38	60	25
Роксазим G2G	DSM, Швейцария	350	720	46	32	58	17
Ровабио Эксель AP	Adisseo, Франция	1490	2850	20	6	57	4
Ксилбеген-Келл	Блювет-Фермент, Болгария	1600	4000	33	32	56	10
Фекорд-2012-Ф	ТД «Фермент», Беларусь	400	200	52	27	47	32
Санзайм	Wuhan SUNNY Biology Co., Китай	1450	4100	34	28	46	8
Хостазим С-100	Блювет, Болгария	500	100	40	52	44	17
Ронозим UP	Novozymes A/S, Дания	130	150	35	37	42	29
Натугрейм TS	BASF, Германия	225	1980	43	—	40	—
Ронозим WX	Novozymes A/S, Дания	15	970	0	30	38	0

Активность характеризуется количеством продукта, образовавшегося в результате действия ферментов на субстрат, и зависит от условий измерения, включая pH среды, её состава, температуры, используемого субстрата, длительности инкубации, интенсивность перемешивания среды и других параметров. В лабораторных условиях измерений используют свободный субстрат, тогда как в кормах субстраты в чистом виде отсутствуют: они встроены в структуру клеток и окружены другими веществами, которые затрудняют доступность к ним ферментов.

В результате эволюции животных в ЖКТ сложились такие условия для переваривания, при которых на пищевые массы по мере их продвижения по ЖКТ, последовательно выделяются новые ферменты, а не действует один фермент на всём его протяжении. Ферменты, используемые в кормлении животных, обладают конкретными свойствами и проявляют активность в определённых условиях; они не адаптированы для действия на всём протяжении ЖКТ. В связи с этим активность коммерческих ферментных препаратов, измеренная в модельном растворе *in vitro*, не может использоваться для ранжирования по эффективности их действия в ЖКТ (Menezes-Blackburn et al., 2015).

Согласно инструкциям по применению кормовых ферментов, которые утверждает «Россельхознадзор» Российской Федерации, активность ферментов указывают на основании декларации производителя (поставщика): они выражаются в виде неких абстрактных единиц без указания условий измерения. Выводы об эффективности действия препаратов можно делать только на основании их испытаний на животных. Полученные результаты могут в дальнейшем воспроизводиться, если фермент будет применяться в аналогичных условиях, главными из которых являются состав рациона и возраст животных. Несоблюдение этих требований приводит к разноречивым выводам об эффективности одного и того же фермента. Недопустимо переносить полученные результаты на ферменты того же назначения, но закупленные у разных производителей.

Во многих научных публикациях сообщают, что применение кормовых ферментов стимулирует потребление корма. Этот вывод в большинстве случаев справедлив, если ферменты применяют на фоне кормов с пониженным содержанием энергии или протеина. Включение ферментов в рацион с достаточным уровнем энергии, приведёт к увеличению её доступности в результате действия ферментов, может снижаться потребление корма и, возможно, возникнет недостаток других питательных веществ. Далеко не всегда учитывают, что под влиянием добавляемых в корма ферментов снижается содержание нежелательной микрофлоры в нижнем отделе кишечника.

Эффективность ферментов зависит не только от способности переваривать целевые субстраты, но и от количества других питательных веществ, которые будучи связанными с неперевариваемыми субстратами не могут перевариваться собственными ферментами.

Существует прямое и косвенное действие, благодаря которому ферменты, переваривающие некрахмальные полисахариды (НПС), улучшают продуктивность. Первое обеспечивает дополнительное поступление энергии в организм.

Важным является косвенное влияние, которое связано со снижением антипитательного действия НПС в результате их разложения. Это приводит к устранению инкапсулирующего действия клеточной стенки и снижению вязкости химуса. В результате повышается доступность ферментов поджелудочной железы к внутриклеточному крахмалу, который является главным источником энергии. Продукты распада НПС клеточной стенки, частично представленные моносахаридами, всасываются, тогда как образующиеся олигосахариды обладают пребиотическими свойствами. Они превращаются микрофлорой до летучих жирных кислот, которые всасываются и являются источником энергии. Кроме того, при снижении pH тормозится размножение колиформных бактерий. Одновременно образующаяся масляная кислота способствует росту микроворсинок щеточной каймы (Masey O'Neill et al., 2014). При этом в целом популяция микроорганизмов снижается, что ведёт к уменьшению потребления ими питательных веществ, повышая их доступность для животного.

Учитывая разнообразие строения и состава клеток растительных кормов и свойств ферментных препаратов, можно ожидать, что некая комбинация ферментативных активностей будет эффективной. Выбирать ферменты для сочетания в полиферментном препарате довольно сложно, любой ферментный препарат с целевым назначением, кроме действия на свойственные ему субстраты, частично преодолевает их антипитательное действие. Ответ на применение ферментов всегда является многофакторным. Ферменты в подходящих условиях всегда переваривают те вещества, на которые они нацелены. Отсутствие зоотехнических результатов может быть связано с неудачным выбором ферментов, нарушением технологии их применения или вызываемой ими разбалансировкой поступающих в организм питательных веществ.

Животные переваривают от 75 до 80% органических веществ корма. Оставшаяся недоступная часть является целевой для воздействия ферментных препаратов, то есть кормовые ферменты или полиферментные препараты необходимо создавать таким образом, чтобы их действие

было нацелено на непереваримую часть корма. Состав непереваренной фракции меняется в зависимости от составных компонентов рациона и физиологических особенностей пищеварения, поэтому для более обоснованного выбора кормовых ферментов необходимо знать или прогнозировать характерные свойства непереваренной части корма.

Выбирая ферменты на основании их специфичности, упускаются из виду особенности их действия в ЖКТ, которому сопутствуют дополнительные эффекты, не связанные с их специфичностью (Bedford, Schulze, 1998). Выбор ферментов связан с текущей доступностью кормового сырья, а также ожидаемой спецификой содержащихся в нём субстратов и возрастных особенностей пищеварения. Можно привести примеры, когда при разработке полиферментных препаратов их действие оказывалось не лучше, чем действие одного из испытуемых ферментов (Kalmendal, Tauson, 2012), хотя имеются и обратные примеры (Masey O'Neill et al., 2014).

Известна закономерность, подтверждающая убывающую отдачу при последующем включении в полиферментный препарат каждой новой активности, поэтому нельзя прогнозировать действие полиферментных добавок путём сложения эффективности действия каждого фермента. В практических условиях эффективность конкретных ферментных препаратов характеризуют величинами прироста доступности обменной энергии (ОЭ), аминокислот, фосфора, кальция из корма, то есть *матрицами*. Матричные значения изменяются в зависимости от типа, активности фермента, возраста и видов животных, а также от состава корма. Чтобы правильно выбрать и применять ферментный препарат, надо понимать, чем обоснованы величины, представленные в матрицах, и насколько они реальны.

Разработка матриц сложное занятие, поскольку ферменты характеризуются не только прямым действием на целевые субстраты, но и косвенным. Значительный диапазон изменчивости величин, характеризующих расщепление субстратов даже одного и того же вида зерна, существенно усложняет прогноз увеличения доступности питательных веществ. Из этого следует, что одной матрицей для конкретного препарата невозможно отразить действие фермента на разные виды сырья, доли которого в комбикормах изменчивы. Проводя исследования на свиньях, пришли к выводу об ошибочности использования матрицы с фиксированным значением для разных типов рационов, так как это приводит к разработке неадекватного рациона (Almeida et al., 2017).

Эффективные сочетания ферментов с различной специфичностью необходимо устанавливать в научных экспериментах и затем подтверждать

в практических условиях. На основании проведенных работ могут быть определены матричные значения действия полиферментных препаратов, которые будут присущи только конкретному сочетанию активностей и только для кормов близкого состава к используемым при разработке рецепта полиферментного препарата. Разрабатывая рецепты кормов с применением компьютерных программ, используют матричные значения ферментных препаратов, которые введены в базу данных сырья.

Существует два способа представления матричных значений, отражающих действие ферментов — по влиянию и по химическому составу. Первый способ отражает величину повышения доступности питательных веществ компонентов корма и выражается в процентах. При этом целесообразно рассчитывать действие фермента отдельно на основные виды сырья (пшеницу, кукурузу, шроты и другие макрокомпоненты).

Второй способ — по химическому составу — более лёгкий для разработчика рецепта, потому что предусматривает изменение питательности всего рациона. При втором способе матричные значения представлены виртуальными величинами, предполагающими, что при добавлении к корму 0,1–0,5 г ферментного препарата на 1 килограмм корма может добавиться 60–100 ккал/кг ОЭ, доступного лизина 40–60 мг, доступного метионина 10–25 мг и фосфора 600–1100 мг. По нашему мнению, этот способ при его простоте обладает важным недостатком: он хуже приспособлен для учёта изменения соотношения основного сырья в рецепте, и поэтому выше риск получения неадекватного рецепта. Применение этого способа создаёт невольные или намеренные «ошибки» продавцов премиксов. Так, при включении фермента в состав премикса, содержащего синтетические аминокислоты, которые являются свободными, то есть обладают 100%-ной доступностью, разработчики рецепта премикса часто налагают на рецепт премикса влияние матрицы фермента. В результате содержание аминокислот в премиксе выражается более высокими значениями по сравнению с реальным количеством аминокислот, включённых в его состав. Применение матриц ферментов при расчёте рецептов премиксов является ошибочным, так как в них отсутствуют субстраты, на которые ферменты могут влиять.

Если вернуться к определению понятия матрица, то это слово, пущенное в оборот коммерсантами для продвижения ферментов, ничего нового к их свойствам не добавило и вполне можно обходиться без него. Таблицы питательности сырья, тоже являются матрицами. Можно сказать: матрица питательности пшеницы, жмыха и т.д., однако, несмотря на то, что питательность распространённого сырья многократно определена, специалисты-практики каждый раз при поступлении новой его партии

определяют лабораторным способом фактический состав, то есть корректируют матрицу питательности. Этот приём стал неписанным правилом.

Возникает вопрос: почему же постоянно пользуются матрицами ферментов, которые однажды были определены или просто рассчитаны и не подвергаются корректировке? Вопрос можно поставить шире: а насколько нужны такие матрицы? В официальных наставлениях по применению ферментов, утверждённых «Россельхознадзором», приведены данные о составе ферментных препаратов и их активности и рекомендуемых дозах препарата, но ни в одном наставлении не приведены матрицы ферментов. Разработчики препаратов, в отличие от продавцов, не могут указать их фиксированные величины, поэтому значения матриц являются неофициальными и пригодны только для рекламных целей.

Материалы и протоколы испытаний, использованных при разработке матриц должны быть доступны потребителям. Результаты их разработки должны основываться на многих повторностях и представляться клиентам. При этом будут получены результаты в каком-то диапазоне колебаний — это естественно, и разработчик должен объяснить, почему в одних случаях действие ферментного препарата было высоким, а в других — слабым и как добиться наибольшей эффективности. Максимальные результаты, полученные разработчиком в идеальных условиях, являются целевым показателем для потребителя, поскольку они достижимы, но не являются гарантируемыми. Для достижения наибольшего результата необходимо обращаться не к матрицам, а запрашивать рекомендации специалистов по сопровождению продукта.

В последние годы всё чаще в рационы включают 2–3 препарата, содержащие разные ферменты. При этом встречаются недопонимания в отношении оценки их возможной эффективности и ошибки в прогнозировании ожидаемой продуктивности. Действие добавки каждого нового фермента зависит от количества присутствующего в корме субстрата. Кроме того, один фермент, например, целлюлаза, разрушая клетчатку оболочек клеток, повышает возможность для действия собственных ферментов животного, субстраты которых находятся внутри клетки. Однако оболочку клеток другими способами разрушают и ксиланаза, и пектиназа, поэтому любой из ферментов, разрушающий оболочку клеток другими путями, сократит возможность появления этого эффекта другим экзогенным ферментом. Ни один расчет не позволяет спрогнозировать действие полиферментных препаратов или нескольких препаратов в рационе.

Наиболее широкое распространение ферменты получили при выращивании молодняка, у которого в раннем возрасте происходят активные изменения пищеварительной системы. Особенно трудно разработать

«правильную» матрицу, характеризующую любой фермент, для цыплят-бройлеров и поросят после отъёмного возраста. На примере изменений доступности ОЭ из пшеницы установлено, что у 7-дневных цыплят величина ОЭ составила 2637 ккал/кг, в 21-дневном возрасте — 2748 ккал/кг и в 35 дней — 2933 ккал/кг. Существенное увеличение ОЭ с возрастом показывает, что пищеварительная система в это время изменяется, достигая максимального извлечения питательных веществ из корма к 35 дням (Bedford, 1996).

При разработке рационов обычно пользуются одним значением ОЭ, взятым из справочников или рассчитанным на основании коэффициентов переваримости питательных веществ, установленных в балансовых опытах в каком-либо одном возрасте. Такой подход к расчету питательности корма и влиянию на неё ферментов не гарантирует успешности в прогнозировании продуктивности. К обещаниям поставщиков ферментов следует относиться с осторожностью, без подтверждения результатов протоколами испытаний их не следует принимать во внимание. При соблюдении вышеперечисленных требований ферменты всегда проявляют положительное действие, однако реальную величину эффективности их применения можно установить только в результате предварительных испытаний препарата в конкретных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волчок А.А., Короткова О.Г., Кондратьева Е.Г., Крюков В.С., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Шашков И.А. Активность глюканаз и ксиланаз кормовых ферментных препаратов в ЖКТ птицы // Птицеводство. 2018. № 4. С. 39–45.
2. Almeida F. N., Vazquez-Añón M., Escobar J. Dose-dependent effects of a microbial phytase on phosphorus digestibility of common feedstuffs in pigs // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2017. Vol. 30. No. 7. P. 985–993.
3. Bedford M. R. The effect of enzymes on digestion // The Journal of Applied Poultry Research. 1996. Vol. 5. No. 4. P. 370–378.
4. Bedford M., Schulze H. 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry // Nutrition Research Reviews. 1996. Vol. 11. No. 1. P. 91–114.
5. Ingelmann C.-J., Witzig M., Möhring J., Schollenberger M., Kühn I., Rodehutschord M. Effect of supplemental phytase and xylanase in wheat-based diets on prececal phosphorus digestibility and phytate degradation in young turkeys // Poultry Science. 2018. Vol. 97. No. 6. P. 2011–2020.

6. Kalmendal R., Tauson R. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal morphology in broiler chickens fed a wheat-soybean meal-based diet // Poultry Science. 2012. Vol. 91. No. 6. P. 1387–1393.

7. Masey O'Neill H.V., Smith J.A., Bedford M.R. Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2014. Vol. 27. No. 2. P. 290–301.

8. Menezes-Blackburn D., Gabler S., Greiner R. Performance of seven commercial phytases in an *in vitro* simulation of poultry digestive tract // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015. Vol. 63. No. 27. P. 6142–6149.

9. Vasquez M.V., Glitsoe V. Phytase Unit Myth! Available at: https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/2012_Phytase_unit_myths.pdf

Evaluation and selection of feed enzymes

Glebova I.V.,¹ Zinoviev S.V.,² Kryukov V.S.³

¹Kursk State Agricultural Academy, Kursk, Russia;

²Federal Scientific Centre 'All-Russian Poultry Research and Technological Institute' of the Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia;

³VetFarmStandard LLC, Moscow, Russia.

Abstract

Endo-1,4-glucanases and endo-1,4-xylanases have been described. Their activity was studied under *in vitro* conditions simulating the gastrointestinal tract of the poultry. A decrease in the temperature of the medium from 50° C to 38° C reduced the activity of all enzymes. Activity at pH=3 was higher than at pH=7. In general, xylanase activity was more stable than glucanase activity. It has been substantiated that the activity indicated by the manufacturer serves only for labeling the product and does not reflect its action in the body. Used matrix values of enzymes are intended for commercial purposes and weakly reflect the real effect of enzyme.

Key words: feed enzymes, activity, matrix values of enzymes

Белковый концентрат в кормлении высокопродуктивных лактирующих коров

Буряков Н.П.,¹ Бурякова М.А.,¹ Заикина А.С.¹, Алешин Д.Е.,¹ Касаткина И.А.²

¹ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева», Москва, Россия;

² СХПК «Племзавод Майский», п. Майский, Вологодская область, Россия.

E-mail: kormlenieskota@gmail.com

Ключевые слова: кормление, протеин, аминокислоты, коровы, молоко, молочная продуктивность, высокопродуктивный скот, белый люпин, мясокостная мука, белковый концентрат

Введение

В результате увеличения населения мира и его приближения к 9,5 млрд человек до 2050 года, а также благодаря росту благосостояния населения в целом спрос на продукты животноводства — мясо и молоко — увеличивается по прогнозам ученых более чем в 2 раза [10, 12]. Обеспечение продовольственной безопасности России является первоочередной задачей развития конкурентоспособного производства отечественных продуктов питания. Производство качественного молока и молочных продуктов имеет огромное значение в экономике страны; они также входят в перечень основных продуктов питания и попадают под действие Доктрины национальной продуктовой безопасности [1, 2, 8, 12].

На современном этапе развития Российской Федерации отводится важное значение увеличению производства качественного молока и молочных продуктов [1, 5, 6, 8]. В современном мире у населения увеличивается потребность на получение качественных продуктов питания животного происхождения, при этом растет спрос не только на продукцию, но и на метод ее получения. В связи с этим научным исследованиям в животноводстве (зоотехнии), защите окружающей среды и здоровья человека необходимо уделять пристальное внимание [5, 6, 8, 9].

Соевый шрот является наиболее важным источником белка, используемым в рационах молочного скота, который содержит около 44% сы-

рого протеина. Тем не менее высокие цены на корма в России и Таиланде и скачкообразность в производстве кормов для животных способствовали поиску альтернативных источников белка, которые могут быть использованы в рационах жвачных животных [9].

Особый интерес представляет изучение влияния кормления с применением отечественных кормовых добавок в составе комбикормов и рационов для животных и их влияние на функциональные свойства получаемых продуктов питания животного происхождения [5, 9, 11].

Белковый концентрат «Агро-Матик» содержит в своём составе зерно белого люпина сорта Дега и продукты переработки птицеводческих мясоперерабатывающих предприятий (отходы внутренних органов), которые проходят двойную баротермическую обработку, с добавлением стабилизирующих консервантов на основе органических кислот. Белковый концентрат в целях обеззараживания растительного и животного сырья проходит температурную обработку при 130°C и давлении 30 атм.

Целью исследования являлось изучение включения белкового концентрата «Агро-Матик» в состав концентратной части рациона разного уровня для молочного скота взамен других белковых кормов. Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- определить молочную продуктивность и качество молока коров за 120 суток лактации;
- исследовать биохимический состав крови подопытных животных;
- дать рекомендации производству.

Материалы и методы

Исследования проводили на ферме «Майский» в хозяйстве СХПК «Племенной завод Майский» Вологодского района Вологодской области. Объектами исследования являлись чистопородные нетели во вторую половину стельности, первотелки и высокопродуктивные коровы старшего возраста айрширской породы с молочной продуктивностью более 8 тыс. кг молока. Животных отбирали по методу пар-аналогов на 8-м месяце стельности с учетом происхождения, пола, возраста (2,0 лактация), живой массы (550 кг), молочной продуктивности за предыдущую лактацию и физиологического состояния. Коровы и нетели были распределены на 3 подопытные группы.

Животные контрольной группы получали основной рацион, применяемый в хозяйстве, который был сбалансирован по питательности, соответствовал нормам кормления ВИЖа (2016) [5] и рассчитан на получение суточного удоя 39 кг молока в период раздоя. Коровы контр-

ольной группы получали основной рацион, применяемый в хозяйстве, однако в состав рациона опытных групп коров включали разный уровень белкового концентрата «Агро-Матик» (1,0 и 1,5 кг соответственно) с одновременным снижением уровня других белковых кормов. Рационы по содержанию обменной энергии и уровню сырого протеина соответствовали контрольной группе.

Качество молока и продуктивность коров в течение опыта измеряли 1 раз в декаду методом контрольных доений с одновременным определением массовой доли жира и белка. В молоке определяли процент молочного жира согласно стандартной методике по Герберу (ГОСТ 5867-1990. «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира») и массовую долю белка методами определения общего азота по Кьельдалю (согласно ГОСТ Р 552462012 «Молоко и молочные продукты. Определение содержания небелкового азота с применением метода Кьельдаля»). Содержание заменимых и незаменимых аминокислот в сухом веществе молока определяли в лаборатории ООО «Эвоник Химия» на спектрометре FOSS AMINONIR DS 2500.

Биохимические показатели крови, отобранной от 9 животных через 2 дня после окончания физиологического опыта, определяли в БУВВО «Вологодская областная ветеринарная лаборатория».

В цельной сыворотке (плазме) крови исследовали следующие показатели:

- глюкозу — колориметрическим методом по цветной реакции с ортолуидиновым реактивом по Гультману в модификации Хиваринена Никкела;
- общий белок — рефрактометрическим способом на рефрактометре ИРВ-22 при помощи таблицы Рейса;
- мочевины — методом Мишон и Арно по реакции с парадиметиламинобензальдегидом;
- кальций — спектрометрическим титрованием с индикатором мурексидом;
- фосфор — колориметрическим методом, основанным на восстановлении фосфорно-молибденовой кислоты;
- каротин — колориметрически.

Биометрическая обработка полученных экспериментальных данных была выполнена на ПК с использованием современных программ Microsoft Office Excel 2010 с помощью метода математической статистики по Антоновой и др. (2011).

Молочную продуктивность подопытных коров определяли в течение 120 дней лактации. В процессе проведения опыта учитывали такие по-

казатели, как суточный и валовой удой молока натуральной и 4%-ной жирности, массовую долю молочного белка и жира, выход молочного белка и жира (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Молочная продуктивность коров за 120 суток лактации, кг

Показатель	Группа (n=15)		
	1-я контрольная	2-я опытная	3-я опытная
Суточный удой молока фактической жирности	32,6±0,82	34,4±0,70	35,8±0,75*
Валовой удой молока натуральной жирности	3910,1±98,56	4123,4±83,92	4297,5±90,27*
Суточный удой молока 4%-ной жирности	32,6±0,90	34,5±1,71	35,8±0,82*
Валовой удой молока 4%-ной жирности	3910,1±107,81	4142,0±205,03	4297,5±98,79*

Примечание: здесь и далее * — разность достоверна по отношению к контролю при $P > 0,95$

Таблица 2. Выход белка и жира с молоком коров за 120 суток лактации, кг

Показатель	Группа		
	1-я контрольная	2-я опытная	3-я опытная
Выход белка молока	127,5±3,24	137,7±3,11*	141,4±3,33*
По отношению к контролю, %	100	108,00	110,90
Выход жира молока	156,4±4,62	166,2±4,16	171,9±4,27*
По отношению к контролю, %	100	106,27	109,91

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что включение белкового концентрата «Агро-Матик» оказывает положительное влияние на удой молока, содержание белка в молоке и выход сухих веществ молока. Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что при введении в рацион 1,0 и 1,5 кг белкового концентрата наблюдали увеличение валового удоя молока 4%-ной жирности, который, в свою очередь, был выше контроля на 5,93 и 9,91% соответственно. При пересчете валового удоя молока натуральной жирности на молоко 4%-ной жирности наблюдалась тенденция к повышению этого показателя в опытных группах.

Валовой удой молока натуральной жирности был достоверно выше в 3-й опытной группе по отношению к контролю и составил 4297,5 кг

молока. Следует отметить, что валовой удой коров 2-й и 3-й опытных групп был выше контроля на 213,3 и 387,4 кг соответственно по сравнению с животными, не получавшими в составе рациона белковый концентрат «Агро-Матик» (табл. 1).

Количество молочного белка в опытных группах возросло по сравнению с животными аналогами из контрольной группы. Следует отметить, что в период опыта у животных 2-й опытной группы было наибольшее содержание молочного жира и белка, значения которых составили 4,03 и 3,34% соответственно. Однако из полученных данных по молочной продуктивности коров при введении белкового концентрата «Агро-Матик» в количестве 1,0 кг наблюдали повышение массовой доли молочного белка и жира по отношению к контрольной группе.

Данные по содержанию молочного жира и белка представлены на рис. 1. В учетный период валовой выход жира и белка молока подопытных групп животных, получавших в составе рациона белковый концентрат «Агро-Матик», был значительно выше, чем у животных-аналогов из 1-й контрольной группы. Наибольший выход молочного жира был отмечен у коров 3-й группы, что было достоверно выше по отношению к уровню в контрольной группе (табл. 2).

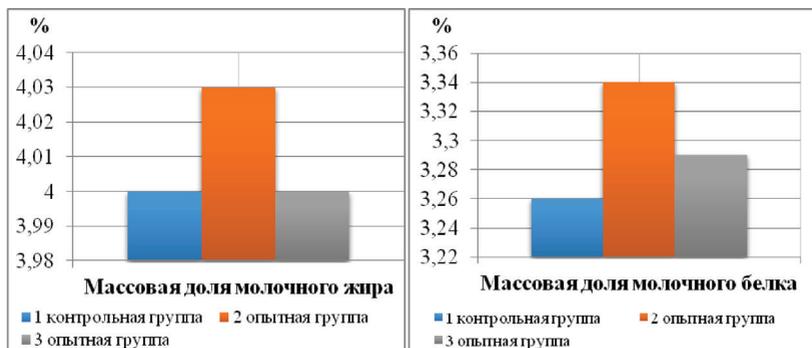


Рис. 1. Массовая доля жира и белка молока коров

В период проведения опыта были получены наибольшие значения по массовой доле жира и белка в молоке коров. Однако, благодаря высокой молочной продуктивности коров, получавших в составе рациона белковый концентрат «Агро-Матик», наибольший выход этих веществ был установлен у коров 3-й опытной группы, что по отношению контролю был выше на 10,90 и 9,91% соответственно.

Потребности человека в белках зависят от его качества и биологической ценности. Согласно нормам ВОЗ по белковому питанию, потребность взрослого человека в белке составляет 100–120 г/сутки, а для детей — 50–70 г/сутки. Биологическая ценность белков молока обуславливается спецификой содержания аминокислот, а также легкой их переваримостью в пищеварительной системе человека [3, 12].

Незаменимыми и обязательными для взрослых людей принято считать восемь аминокислот — метионин, лизин, триптофан, фенилаланин, треонин, изолейцин, валин и лейцин, дополнительно для новорожденных детей необходимы — цистин, аргинин и гистидин [3, 4, 7].

Изучив аминокислотный состав молока коров, следует отметить, что включение белкового концентрата в состав рациона коров положительно сказалось на содержании незаменимых аминокислот в молоке (табл. 3).

Таблица 3. Содержание незаменимых аминокислот в молоке коров, мг%

Показатель	Группа		
	1-я контрольная	2-я опытная	3-я опытная
Метионин	85,2±3,35	95,4±5,20	93,4±3,60
Лизин	234,0±8,44	262,8±11,27	263,6±8,60
Треонин	115,8±115,8	130,3±6,72	125,7±4,47
Триптофан	46,6±1,27	52,0±2,09	49,8±2,13
Аргинин	105,7±3,67	121,0±6,75	120,1±5,59
Изолейцин	182,0±2,14	186,7±10,94	193,8±10,71
Лейцин	291,8±5,00	273,6±18,10	284,5±15,77
Валин	183,8±2,27	194,1±17,37	187,83±15,16
Гистидин	84,9±3,16	81,5±4,47	84,4±3,23
Фенилаланин	150,3±1,28	149,0±6,04	157,8±1,81*
Сумма незаменимых аминокислот	1480,17±5,85	1546,5±5,59	1560,9±16,90*
% к контролю	100,00	104,5	105,8

Известно, что растительные белки у человека усваиваются только на 75%, а животные могут достигать более 90%. Однако по последним исследованиям в медицине, на долю животных белков в суточном рационе человека должно приходиться не менее 55% от общего количества белков. В связи с высоким потреблением в рационе растительных белков наблюдается недостаток незаменимых аминокислот, таких как лизин, лейцин, метионин и треонин. Лизин оказывает влияние на отложение кальция в костях, образование эритроцитов и является необходимым для азотистого обмена [3, 7].

Наибольшее содержание аланина, треонина, метионина и лейцина, а также глутаминовой кислоты обнаружено в сердце по сравнению с другими мышцами. В печени наблюдается высокое содержание метионина, глицина, треонина, лейцина, фенилаланина и гистидина. На образование молока расходуется более 70% поступивших в организм аминокислот. В исследованиях, проводимых на лактирующих коровах с годовой молочной продуктивностью 6–8 тыс. кг и жирностью молока 3,4%, выявлено, что при сбалансированном составе обменного протеина потребность в незаменимых аминокислотах, таких как метионин и лейцин, были дефицитными. Анализируя полученные данные, следует отметить, что содержание лизина в молоке коров опытных групп был выше уровня контрольной группы на 28,8 и 29,6 мг% соответственно.

Метионин — является донором метильных групп, участвует в процессе синтеза стероидов, адреналина, креатинина, холина, цистеина и является источником серы при образовании витамина В₁ [3, 4, 7]. В наших исследованиях согласно полученным данным по содержанию метионина у животных, получавших в составе рациона белковый концентрат в количестве 1,0 и 1,5 кг на голову в сутки, наблюдалось увеличение выхода метионина на 10,2 и 8,2 мг% соответственно (рис. 2).

Увеличение содержания триптофана в молочных продуктах имеет очень важное значение, так как эта аминокислота является предшественником никотиновой кислоты, которая необходима для синтеза гемоглобина и регулирует эндокринную систему, препятствует развитию пеллагры. Скармливание белкового концентрата в составе рациона в количестве 1,0 кг/гол/сутки способствовало наибольшему выходу триптофана с молоком, где этот показатель составил 52 мг% против 46,6 мг% в контрольной группе. Применение белкового концентрата привело также к незначительному снижению уровня гистидина в молоке на 3,4 и 0,5 мг% соответственно.

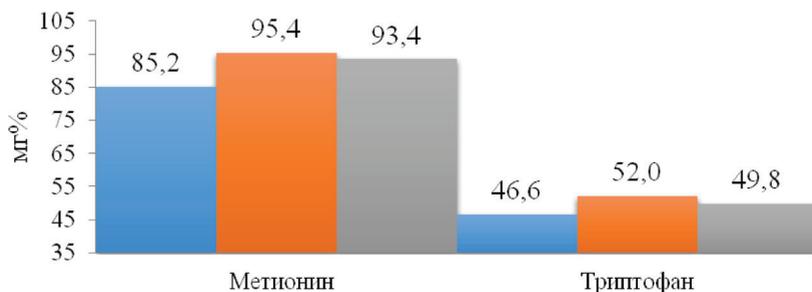


Рис. 2. Содержание метионина и триптофана в молоке коров

Фенилаланин облегчает депрессию, уменьшает чувство голода, является источником норадреналина, адреналина, тироксина, участвует в процессе кроветворения и входит в состав инсулина в большом количестве [3, 7]. При анализе полученных данных следует отметить, что применение белкового концентрата в количестве 1,0 кг на голову в сутки способствовало снижению выхода уровня фенилаланина на 1,3 мг%, однако при этом введение его в большем количестве (1,5 кг/гол./сут.) способствовало достоверному повышению его выхода с молоком.

Физиологическое состояние животных является основным фактором, обеспечивающим высокую эффективность получения качественного молока-сырья, здорового приплода и обеспечения продуктивного долголетия коров. Процесс обмена веществ в организме коров представляет собой ряд сложных биохимических превращений питательных веществ, которые в процессе пищеварения расщепляются до мономеров и поступают в кровь и лимфу из пищеварительной системы.

Одними из основных показателей здоровья и физиологического состояния, которые в полной мере отражают нарушение гомеостаза, диагностируют возникновение заболеваний и отражают уровень обмена веществ в организме молочного скота и его состояние, являются биохимические показатели цельной сыворотки и плазмы крови. Любые изменения в обмене веществ молочного скота от нормальных значений преимущественно приводят к снижению молочной продуктивности, состояния здоровья и процессов воспроизводства в целом.

Одним из главных показателей уровня углеводного обмена в организме сельскохозяйственных животных является концентрация глюкозы в крови. У животных 2-й опытной группы, получавших 1,0 кг белкового концентрата в составе рациона, наблюдали высокий уровень глюкозы в крови, что по отношению к контрольной группе было выше на 0,51 ммоль/л.

Основным показателем протеинового обеспечения организма является содержание общего белка в сыворотке крови. Белок является строительным материалом для клеток тканей организма и активно участвует в образовании молока.

Анализируя данные табл. 4, следует отметить, что содержание общего белка в сыворотке крови у животных 3-й опытной группы изменялось незначительно (82,4 г/л против 77,8 г/л в контроле). Однако в период опыта наблюдали достоверное увеличение данного показателя у коров, получавших 1,0 кг белкового концентрата «Агро-Матик» и по отношению к коровам контрольной группы. У подопытных животных, которые получали в составе рациона 1,5 кг белкового концентрата, уровень

общего белка в сыворотке крови коров увеличился на 4,6 г/л (5,9%) по сравнению с контрольной группой, что, в свою очередь, является следствием увеличения эффективности использования азота в организме лактирующих коров на синтез молочного белка.

Таблица 4. Биохимические показатели крови подопытных коров в период раздоя, ммоль/л

Показатель	Группа			Физиологическая норма
	1-я контрольная	2-я опытная	3-я опытная	
Глюкоза	2,17±0,039	2,68±0,051*	2,22±0,025	2,22–3,33
Общий белок, г/л	77,8±0,61	86,9±1,68*	82,4±2,82	72–86
Мочевина	6,34±0,118	5,61±0,212	6,53±0,647	3,3–6,7
Кальций	2,44±0,435	2,42±0,102	2,52±0,243	2,5–3,13
Фосфор	1,66±0,174	1,60±0,105	1,71±0,276	1,45–1,94
Каротин, мг%	0,60±0,029	0,65±0,051	1,00±0,149	0,4–1,0

Для оценки минерального обмена в сыворотке крови животных определяют уровень кальция и фосфора. Ионы кальция участвуют в процессе свертываемости крови, способствуют взаимодействию актина с миозином и выделению ацетилхолина. Уровень кальция зависит от содержания витамина D, кальция и фосфора в рационе коров. Принято считать, что концентрация кальция в сыворотке крови коров напрямую зависит от его уровня в рационах. Уровень кальция в сыворотке крови в норме составляет 2,5–3,5 ммоль/л, в то время как снижение этого показателя до 2,0 ммоль/л и ниже или повышение более 3,5 ммоль/л свидетельствуют о нарушении минерального обмена, что связано с возникновением заболеваний. В наших исследованиях уровень кальция в крови животных 3-й группы был в пределах нормальных значений и составил 2,52 ммоль/л. Однако при этом следует отметить, что у животных 1-й контрольной и 2-й опытной групп этот показатель был ниже физиологических норм — 2,44 и 2,42 ммоль/л, что меньше нижнего порогового значения нормы на 2,4 и 3,2% соответственно.

Недостаток фосфора, либо его несбалансированное отношение с кальцием вызывает нарушение функционирования яичников. Согласно полученным данным по содержанию кальция и фосфора в сыворотке крови наибольшее его значение имели животные 3-й опытной группы — 2,52 и 1,71 ммоль/л соответственно, что было в пределах нормальных физиологических значений.

Включение белкового концентрата «Агро-Матик» в количестве 1,5 кг/гол./сут. способствовало достоверному увеличению суточного удоя молока коров натуральной жирности. Молочная продуктивность коров опытной группы за период раздоя составила 4297,5 кг, что на 9,82% выше, чем у аналогов из контрольной группы.

Установлено, что выход молочного белка за период раздоя был достоверно выше у животных, получавших разный уровень белкового концентрата по сравнению с животными контрольной группы.

Максимальное количество суммы незаменимых аминокислот в молоке коров 3-й опытной группы было достоверно выше и составило 1560,9 мг% против 1480,17 мг% в контроле. Скармливание лактующим коровам рационов с разным уровнем белкового концентрата не оказало отрицательного влияния на биохимические показатели крови. Значения показателей крови опытных животных были в пределах физиологической нормы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буряков Н.П., Прохоров Е.О. Использование безалкалоидного люпина в кормлении лактирующих коров // Сыроделие и маслоделие. 2017. № 3. С. 53–56.

2. Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы. М.: Росинформагротех, 2012. 270 с.

3. Гунькова П.И., Горбатова К.К. Биотехнологические свойства белков молока: монография. СПб.: Гиорд, 2015. 216 с.

4. Молоко: производство, реализация, качество // Вестник ветеринарии. 2010. № 4 (55). С. 50.

5. Рекомендации по детализированному кормлению молочного скота: справочное пособие / ВИЖ им. Л.К. Эрнста; А.Г. Головин, А.С. Аникин [и др.]. Дубровицы: ВИЖ им. Л.К. Эрнста. 2016. 242 с.

6. Al-Katanani Y.M., Webb D.W. & Hansen P.J. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate // Journal of Dairy Science. Vol. 82. No. 12. P. 2611–2616.

7. Amino Acids in Animal Nutrition / J.P.F. D'Mello (Ed.). 2nd edn. Wallingford, Oxon, UK; Cambridge, MA, USA: CABI Publishing, 2003. P. 513.

8. Buryakov N., Buryakova M., Prokhorov E., Aleshin D. Efficiency of white lupin grain in composition of feed for dairy cattle // 18th International Scientific Conference Engineering for Rural Development, Jelgava, 22–24 May 2019, P. 407–412.

9. Cherdthong A., Sumadong P., Foiklang S., Milintawisamai N., Wanapat M., Chanjula P., Gunun N., Gunun P. Effect of post-fermentative yeast biomass as a substitute for soybean meal on feed utilization and rumen ecology in Thai native beef cattle // *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2019. Vol. 28. No. 3. P. 1–16.

10. Godfray H.C., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., Toulmin C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 2010. Vol. 327. No. 5967. P. 812–818.

11. González J., Rodríguez C., Andrés S., Alvir M. Rumen degradability and microbial contamination of fish meal and meat meal measured by the in situ technique // *Animal Feed Science and Technology*. 1998. Vol. 73. No. 1–2. P. 71–84.

12. Lima J., Auffret M.D., Stewart R.D., Dewhurst R.J., Duthie C.A., Snelling T.J., Walker A.W., Freeman T.C., Watson M., Roehe R. Identification of rumen microbial genes involved in pathways linked to appetite, growth, and feed conversion efficiency in cattle // *Frontiers in Genetics*. 2019. Vol. 10. P. 701.

Protein concentrate in feeding highly productive lactating cows

Buryakov N.P.,¹ Buryakova M.A.,¹ Zaikina A.S.¹, Aleshin D.E.,¹ Kasatkina I.A.²

¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;

²APC «Plemzavod Maysky», Maysky, Vologda Region, Russia.

Keywords: feeding, protein, amino acids, cows, milk, milk productivity, highly productive cattle, white lupine, meat and bone meal, protein concentrate

УДК 636.2:636.087

Использование пробиотического препарата в поении лактирующих коров

Ковалева О.В.

ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья», Тюмень, Россия

E-mail: lemur.84@mail.ru

Аннотация

Организм животных подвергается воздействию целого комплекса негативных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности, среди которых заметно влияние ухудшающейся экологической обстановки. Одним из современных подходов к решению проблемы являются разработка, производство и применение новых экологически безопасных и эффективных пробиотических препаратов, способных обеспечить не только биологическую защиту, но и увеличение продуктивности животных. В результате проведенных исследований установлено, что молоко от животных, в поении и обработке которых использовались пробиотические продукты, благополучно по микробиологическим показателям.

Ключевые слова: пробиотик, физиологическое состояние, соматические клетки, резистентность

Введение

Обеспечение продовольственной и биологической безопасности страны является основной задачей агропромышленного комплекса на современном этапе, что делает актуальными научные разработки, направленные на их решение [6, 9].

Организм животных подвергается воздействию целого комплекса негативных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности, среди которых можно выделить влияние ухудшающейся экологической обстановки [7, 8], увеличение количества стрессовых ситуаций, массовое бесконтрольное использование химиотерапевтических препаратов, в том числе и антибиотиков.

В отличие от антибиотиков, пробиотики физиологичны по своему действию и безвредны для животных. Положительный эффект пробиотиков обусловлен их участием в процессах пищеварения и метаболизма организма, биосинтезом и усвоением белка и многих других биологически активных веществ, обеспечением резистентности микроорганизмов [3, 4, 10].

Одним из современных подходов к решению проблемы являются разработка, производство и применение новых экологически безопасных и эффективных препаратов пробиотических препаратов, способных обеспечить не только биологическую защиту, но и увеличение продуктивности животных [1, 5].

Целью настоящей работы были оценка влияния пробиотических продуктов на физиологическое состояние лактирующих коров, а также проведение сравнительной оценки органолептических, микробиологических и технологических свойств молока.

Материалы и методы

Научно-хозяйственный опыт был проведен на базе АО «ПЗ Учхоз ГАУ Северного Зауралья» в течении трех месяцев.

Экспериментальная часть работы проводилась в зимне-стойловый период, на коровах черно-пестрой породы. Для проведения научно-хозяйственного опыта были сформированы две группы животных-аналогов по 10 голов в каждой с учетом породы, возраста, живой массы, продуктивности и физиологического состояния. В опытной группе в поении использовался пробиотический продукт PIP Plus Water, представляющий собой концентрат пробиотиков группы *Bacillus*. В качестве обработки после доения применялся пробиотический продукт Animal House Stabilizer путем распыления на соски вымени. Обработки и поение пробиотиками проводились согласно схемам, рекомендуемым фирмой производителем.

Оценка органолептических, микробиологических и технологических свойств молока проводилась в лаборатории перерабатывающего завода. С целью оценки физиологического состояния животных в начале и в конце эксперимента исследовали кровь на морфологические и биохимические показатели в Тюменской областной ветеринарной лаборатории.

Результаты и обсуждение

По данным некоторых исследователей, взрослым животным применять пробиотические препараты для кардинальной коррекции кишечной микрофлоры практически бесполезно и начинать оздоровление жи-

вотных необходимо только с молодняка. Кишечная микрофлора взрослых особей, выращенных без применения пробиотиков, сформирована в соответствии с окружающим её микробиоценозом, который влиял на функционирование иммунной системы организма и определял уровень его иммунного реагирования.

Повсеместный анализ рационов Тюменской области показывает, что дефицит сахаров в рационах составляет 40–60%. Для обеспечения роста продуктивности и поддержания её на высоком уровне в рационы высокопродуктивного стада включают повышенное количество концентратов. Таким образом, недостаток энергии легкоусвояемых углеводов восполняется более доступным крахмалом зерновых.

Это сравнительно дёшево, но увеличение доли концентратов (по сухому веществу) влечёт за собой негативные последствия, связанные со сдвигом рН рубца в кислую сторону, в результате чего возникают заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у животных. Дисбалансы рациона, некачественный сенаж, микотоксины корма и низкое содержание клетчатки в рационе приводят к подавлению процессов переваривания в рубце; грамотрицательные бактерии гибнут, и образуются экзо- и эндотоксины.

С целью оценки фактического присутствия пробиотиков в воде был проведен её анализ в Областной ветеринарной лаборатории (табл. 1).

Таблица 1. Бактериологическое исследование воды

Показатели	Результат исследования		
	бак- распределитель	поилка – контроль	поилка – опыт
Термотолерантные колиформные бактерии	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Общие колиформные бактерии	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Общее микробное число, КОЕ/мл	9	15	$3,8 \times 10^5$

Наиболее важной операцией ежедневного технического обслуживания доильного оборудования является его промывка. Санитарная обработка включает комплекс мероприятий, направленных на уничтожение патогенных и снижение количества непатогенных микроорганизмов до такого уровня, когда они не оказывают существенного влияния на качество молока.

Избыточное поступление с некачественными объемистыми кормами органических кислот, особенно масляной, обладающей кетогенным действием, оказывает медленное токсическое действие на организм животных, что мы и наблюдаем по биохимическим показателям крови животных (табл. 2).

Таблица 2. Биохимические показатели крови животных

Показатель	Норма	Начало опыта		Конец опыта	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Кальций, моль/л	2,1–2,8	1,20	1,15	1,46	1,94
Фосфор, ммоль/л	1,4–2,5	1,34	1,76	2,1	2,3
Магний, ммоль/л	0,7–1,2	2,03	0,9	0,59	0,6
Мочевина, ммоль/л	2,8–8,8	8,8	11,9	5,19	4,8
Общий белок	6,2–8,2	6,0	4,5	7,9	7,98
Глюкоза, ммоль/л	2,3–4,1	3,37	1,9	3,1	2,9
Железо, ммоль/л	18–28	11,8	7,6	14,8	14,1
Щелочная фосфатаза, ед/л	18–123	22,6	31	36	27,6
Кетоновые тела	отрицательные	отрицательные	1 положительная	отрицательные	1 положительная

Уменьшение выделения в кровь изоферментов привело к пониженным значениям щелочной фосфатазы. В основном это связано с нарушением фосфорно-кальциевого обмена. Недостаток кальция сопряжен с рядом заболеваний и осложнений, таких как задержка последа (недостаточная активность гладкой и поперечнополосатой мускулатуры), растяжения и травмы в результате падения или поскальзывания, нарушение глотательного рефлекса. Еще одним результатом этого в хозяйстве являются и маститы, возникающие в случаях повреждения сосков, нарушения механизма закрытия сосков, ушибы вымени и т. д. Кроме того, дефицит кальция негативно влияет на работу иммунных клеток, то есть открываются ворота инфекциям.

Содержание глюкозы в крови было ниже физиологической нормы (2,3–4,1 ммоль/л), что наблюдается на общем фоне дефицита энергии и при недостатке легкоусвояемых углеводов в кормах и поражении печени.

Кетоновые тела в крови (β -оксимасляная и ацетоуксусная кислоты, ацетон) являются промежуточными продуктами обмена жиров, углеводов и белков. Их общее количество в цельной крови здоровых животных

составляет 0,5–6 мг. Стойкое повышение кетоновых тел в крови у высокопродуктивных коров наблюдается при развитии кетоза.

До последнего времени проблема дефицита микроэлементов в рационах решалась путем использования витаминно-минеральных премиксов, которые содержат их неорганические соли, но известно, что биологическая доступность микроэлементов из этих соединений невысокая.

При недостатке солей кальция в кормах нарушается минеральный обмен в организме коров, следствием чего является повышение титруемой кислотности молока, которая влияет на снижение термоустойчивости молока, что затрудняет дальнейшую его переработку.

Пробиотики, как составная часть рациона кормления, оказывают влияние на организм животного, которое выражается, например, в изменении рН в рубце, снижении конверсии, улучшении метаболического обмена.

В процессе пищеварения, а, значит, в работе ЖКТ немало важную роль играет руминация. Сдвиг кислотно-щелочного равновесия, когда интенсивно образуется молочная кислота, ведет к торможению моторики преджелудков, что и наблюдалось на момент начала опыта: жвачка отсутствовала у 50% коров в опытной группе, а к концу проведения эксперимента с использованием пробиотиков жвачка стала наблюдаться у 72% коров, в то время как у поголовья контрольной группы это количество практически не менялось за аналогичный период и составляло 76–80%.

Если наблюдается изменение регулярности жвачки, ее длительности или иных ее параметров, то это является верным свидетельством того, что желудок коровы страдает атонией или корова недостаточно пережевывает корм [2]. Наряду с ацидозами, отсутствие энергии сахаров в рационах является одной из главных причин нарушения белкового, углеводного и жирового обменов. При этом в тканях и крови организма накапливаются кетоновые тела, что сказывается на снижении упитанности животных. Так, средняя упитанность коров на начало опыта в опытной группе колебалась в пределах 1,5–2,5 балла, а в контрольной группе — 2,5–4 балла; идеальной ситуацией является упитанность 2,5–3,5 баллов в пике лактации.

Современные технологии переработки молока предъявляют высокие требования к качеству молока-сырья, которое во многом определяется его физико-химическими и технологическими свойствами. Свежевыдоенное молоко обладает определенными органолептическими свойствами, плотностью, точкой замерзания и кипения, вязкостью, кислотностью, термостабильностью.

К основным контролируемым микробиологическим показателям молока относят общую бактериальную обсемененность, количество соматических клеток и патогенных микроорганизмов.

Соматические клетки в молоке являются индикатором воспалительных процессов, протекающих в молочной железе. Концентрация клеток выше 500 тыс. в 1 мл молока характерна при наличии мастита, что ведет к снижению продуктивности.

В отличие от бактериальной обсемененности молока число соматических клеток снижается не так быстро: слишком много факторов оказывает влияние на их присутствие, и в том числе болезни, лечение которых отнимает много времени (рис. 1).

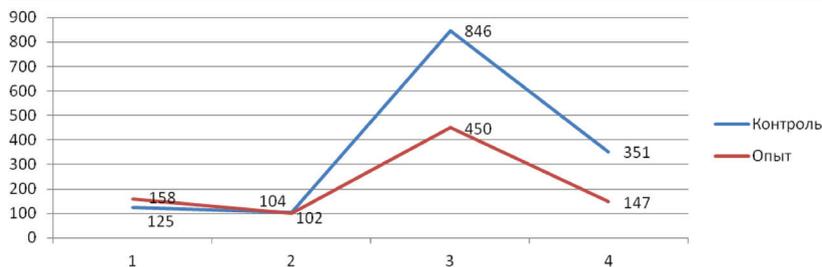


Рис. 1. Изменение количества соматических клеток по общей пробе

Количество соматических клеток в опытной группе коров на момент начала опыта было больше, чем в контрольной группе на 20,8%. Через 90 дней этот показатель в опытной группе был на 58,1% меньше, чем в контроле, и составил 147 тыс./см³. Затем наблюдалось дальнейшее снижение данного показателя еще на 30,43%. В контрольной группе коров количество соматических клеток в целом увеличилось на 64%, а в опытной снизилось на 7,5%. Патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл, в молоке обеих групп обнаружено не было.

Отклонения в составе молока, вызванные изменением рациона животных, существенно влияют на показатель титруемой кислотности молока, а, следовательно, и на его термоустойчивость.



Рис. 2. Изменение кислотности молока исследуемых животных

По данным стойловой пробы кислотность в течении месяца в среднем увеличилась у опытных животных с 17 до 18,5°Т, у контрольных животных — с 15,5 до 17,5°Т. Таким образом, увеличение в опытной группе произошло на 1,5°Т, а в контрольной — на 2°Т.

Заключение

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что молоко, полученное от животных, в поении и обработке которых использовались пробиотические продукты, благополучно по микробиологическим показателям. Следует отметить, что в молоке опытной группы коров количество соматических клеток и кислотность стали значительно ниже, а это является показателем того, что использование пробиотиков может оказывать влияние на естественную резистентность организма, обеспечивая тем самым более высокое качество получаемого молока-сырья за счет повышения резистентности организма, стимуляции деятельности пищеварительного тракта, а также улучшения переваримости и усвоения основных питательных веществ корма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурцева Н.В. Взаимосвязь количества эндобионтных инфузорий рубца и продуктивных показателей коров при использовании кормовых добавок // Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов — регион: сборник научных трудов по результатам работы IV Международной молодежной научно-практической конференции. 2019. С. 156–161.
2. Иванова И.Е., Волынкина М.Г., Ковалева О.В. Влияние кормления на биохимический состав крови коров в условиях севера Тюменской области // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. 2013. № 10. С. 38–42.
3. Ковалева О.В., Волынкина М.Г., Иванова И.Е. Использование ферментных добавок в рационах молочных коров и свиней // Главный зоотехник. 2012. № 12. С. 23–29.
4. Ковалева О.В., Казакова Н.В., Тажитдинова С.Т. Использование мультиэнзимного комплекса «Кемзайм W» в рационах поросят // Аграрный вестник Урала. 2007. № 6 (42). С. 72–73.
5. Ковалева О.В. Эффективность использования биоэмульгатора и мультиэнзимного комплекса в рационах молодняка свиней: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.02 / Сиб. науч.-исслед. и проект.-технол. ин-т животноводства. Тюмень, 2008. 158 с.

6. Костомахин Н.М., Волынкина М.Г., Ковалева О.В., Иванова И.Е., Кармацких Ю.А. Состояние и перспективы развития животноводства Тюменского региона // Молочное и мясное скотоводство. 2019. № 1. С. 9–13.
7. Костомахин Н.М., Кармацких Ю.А. Препарат «Мегабрик Препавел» в рационах сухостойных коров // Главный зоотехник. 2019. № 7. С. 11–19.
8. Пальшин А.Н., Иванова И.Е. Молочная продуктивность коров голштинской породы в ООО «ЗапСибХлеб-Исеть» // Сборник статей II Всероссийской (национальной) научно-практической конференции «Современные научно-практические решения в АПК». Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2018. Ч. 1. С. 40–43.
9. Bakharev A.A., Sheveleva O.M., Fomintsev K.A., Grigoryev K.N., Koshchayev A.G., Amerkhanov K.A., Dunin I.M. Biotechnological characteristics of meat cattle breeds in the Tyumen Region // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2018. Vol. 10. No. 9. P. 2383–2390.
10. Kovaleva O., Sannikova N. Use of biotechnological preparations in pig breeding // International scientific and practical conference “Agro-SMART — Smart solutions for agriculture” (Agro-SMART 2018). Advances in Engineering Research. 2018. Vol. 151. P. 383–390.

The use of a probiotic preparation in drinking lactating cows

Kovaleva O. V.

Northern Trans-Ural State Agricultural University, Tyumen, Russia

Abstract

The animal organism is exposed to a whole range of negative factors affecting the normal functioning of the basic systems of life, among which the influence of a deteriorating environmental situation is noticeable. One of the modern approaches to solving the problem is the development, production and use of new environmentally friendly and effective probiotic preparations that can provide not only biological protection, but also increase the productivity of animals. As a result of the studies, it was found that milk from animals, in the drinking and processing of which probiotic products were used, was microbiologically safe.

Key words: probiotic, physiological state, somatic cells, resistance

УДК 579.64

Высокоэффективные кормовые добавки для животных на основе биопленки *Bacillus subtilis* на фитоносителе

Ушакова Н.А.,¹ Правдин В.Г.,² Кравцова Л.З.²

¹ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» РАН, Москва, Россия;

²ООО «Научно-технический центр биологических технологий в сельском хозяйстве», Шебекино, Белгородская область, Россия.

E-mail: naushakova@gmail.com

Аннотация

Получение пробиотических препаратов в виде биопленки является новым направлением в биотехнологии. Разработан процесс твердофазного культивирования пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* и получения биопленок на твердом носителе (препарат синбиотика ПроСтор и его модификация Санвит-К). Технология получения кормовых добавок имитирует жизненные условия кишечных микросимбионтов и включает твердофазную ферментацию свекловичного жома. Конечный продукт содержит пробиотическую биомассу, продукты их метаболизма, микросорбент (фиточастицы свекловичного жома), пребиотики (пектины свеклы), а также фиточастицы расторопши и эхинацеи. Полученные данные об эффективности ПроСтор и его модификации были подтверждены в ходе обширных производственных испытаний.

Ключевые слова: пробиотик, биопленка, пребиотик

Развитие фундаментальных исследований симбиотических взаимодействий организма и его микробиоты получило новое направление в связи с появлением представлений о существовании бактерий в виде биопленок, что определило уточнение роли пробиотиков и особенно — пробиотиков кормового назначения (Ушакова с соавт., 2012). Кормовые пробиотические препараты находят широкое применение в практике животноводства, позволяют усовершенствовать существующие системы разведения и кормления сельскохозяйственных животных, становятся важным компонентом современного рационального кормления животных. Установлено, что применение пробиотиков может оказывать

противоинфекционное, иммуномодуляторное воздействие на организм, повышать барьерные функции (физиологические механизмы, защищающие организм от воздействия окружающей среды, препятствующие проникновению в него бактерий, вирусов и вредных веществ), стимулировать моторику и экскреторную функции кишечника.

Введенные с препаратами пробиотические штаммы взаимодействуют с сообществом бактерий кишечника (Ушакова с соавт., 2013), выделяют метаболиты, влияющие на активность иммунной, гормональной, пищеварительной систем организма-хозяина. Аспекты использования пробиотиков затрагивают широкий круг проблем, связанных с коррекцией кишечного биоценоза, иммунной, гормональной и ферментной систем молодняка и взрослых животных. Кроме того, использование пробиотиков имеет актуальное значение не только для животноводства, но и для здравоохранения в целях снижения риска заболеваемости людей и повышения экологической безопасности сельскохозяйственной продукции.

В настоящее время концепция пробиотиков претерпела существенные изменения. Определяющим фактором эффективности пробиотиков во многом являются технологии получения этих препаратов. Современный подход к разработке пробиотических препаратов подразумевает применение различных видов микроорганизмов в определенных сочетаниях, выпуск их в форме, допускающей длительное хранение при обычной температуре, не теряющих своих свойств в процессе производства комбикормов и кормовых добавок (грануляции, экструдирования и т. п.), а также обладающих высокой биологической активностью в химусе. Клинико-экспериментальные исследования показали, что под действием желудочного сока и желчи пробиотики теряют почти 90% своей активности к моменту попадания в кишечник (Бондаренко, Мацулевич, 2007). Разрабатываются различные способы повышения выживаемости бактерий, например, за счет их иммобилизации на пористых микроносителях, включения в состав препарата компонентов питательной среды. Получение пробиотических препаратов в виде биопленки — новое направление биотехнологии.

Разработан процесс твердофазного культивирования пробиотических штаммов вида *Bacillus subtilis* и получение биопленки на твердом носителе (синбиотический препарат ПроСтор и его модификация Санвит-К). Препараты производятся по уникальной технологии, которая включает стадию твердофазного культивирования пробиотических бактерий на фитоносителе (специально подготовленный свекловичный жом). Технология получения препаратов частично имитирует условия жизнедея-

тельности кишечных микросимбионтов и включает неполное твердо-фазное сбраживание пробиотической ассоциацией свековичного жома (Ушакова с соавт., 2009). В результате образуется биопленка на поверхности фитоносителя, которая позволяет сохранять жизнеспособные бактерии, их метаболиты и биологически активные вещества (рис. 1).

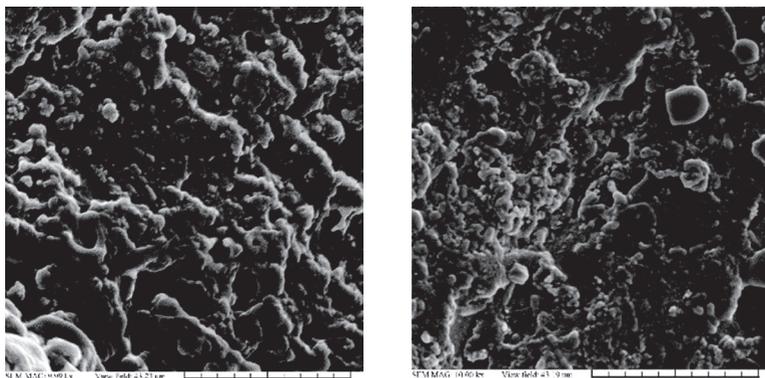


Рис. 1. Микрофотографии образцов препаратов с биопленкой *Bacillus subtilis*.

Масштабный отрезок 30 μm .

Конечный продукт включает биомассу пробиотиков, продукты их метаболизма, продукты биотрансформации фитосубстрата и фитоконпоненты. Пробиотический эффект бацилл сочетается с эндогликканазной, протеолитической, и амилазной активностями. В препаратах содержится набор важнейших ферментов: целлюлаза, эндогликканаз, амилаза, комплекс протеаз, липаза, органические кислоты, биологически активные вещества, витамины и аминокислоты, иммуноактивные пептиды — продукты метаболизма пробиотиков. В препарат входят фиточастицы, являющиеся клетчатковым микросорбентом, и пребиотики — пектины свеклы. Пробиотические бактерии отличаются повышенной жизнеспособностью и устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды, поскольку находятся в виде биопленки на фитоносителе, а также адаптированы к условиям жизнедеятельности в кишечнике в процессе получения препарата.

Исследования показали, что в биопленке по-иному, в сравнении с чистыми культурами бактерий, происходят их физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ. Особое значение имеют сигнальные вещества, обеспечивающие взаимодействие клеток в биопленке. По-видимому, такие вещества могут

служить аналогами регуляторных молекул животного организма. Можно предположить, что соматостатин-подобный пептид, обнаруженный при развитии некоторых штаммов *Bacillus subtilis*, в том числе использующихся в пробиотической ассоциации препарата ПроСтор, является фактором межклеточной коммуникации (Ушакова с соавт., 2010).

Известно, что грамположительные бактерии осуществляют обмен информацией, используя олигопептидные сигнальные молекулы. Согласно симбиогенетической теории происхождения эукариот многие сигнальные молекулы, общие для бактерий и эукариот, у первых выполняли синэкологические функции (обеспечение взаимодействия клетки с другими членами прокариотного сообщества), а у вторых стали обеспечивать согласованную работу клеток многоклеточного организма. При получении биоупленки в препарате ПроСтор очевидно действие системы межклеточной коммуникации бактерий по принципу «Кворум сенсинг» (QS), способствующей выживанию вегетативных клеток (Kohli et al., 2018) Поэтому препараты, основанные на получении биоупленки пробиотиков, отличаются от препаратов-аналогов наличием сигнальных веществ бактериального происхождения, влияющих на гомеостаз многоклеточных организмов-хозяев.

Препарат ПроСтор отличается дополнительным включением фиточастиц лекарственных растений — расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn. и эхинацеи пурпурной *Echinacea purpurea* L. Фенолкарбоновые кислоты, содержащиеся в корнях эхинацеи, укрепляют иммунитет, обладают противовирусным, противогрибковым действием. Расторопша содержит вещества, которые защищают и восстанавливают клетки печени, улучшают пищеварительные процессы. Для изучения влияния комплексного препарата ДБА ПроСтор на зоотехнические и физиолого-биохимические показатели цыплят в условиях вивария ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП» РАСХН был проведён опыт на бройлерах кросса «Кобб-500». Среднесуточный прирост живой массы опытных цыплят составил 63,31 г при расходе 1,65 кг корма на 1 кг прироста живой массы. Полученные в ходе научных экспериментов данные об эффективности препарата получили подтверждение и в широких производственных испытаниях.

Испытания ПроСтор в ЗАО «Приосколье» (Белгородская область) в опытах на 900 тыс. голов показали снижение санитарного брака на 15%, увеличение среднесуточного привеса на 1,3%, увеличение сохранности на 0,3%, снижение конверсии корма (повышение эффективности пищеварения) на 0.6%. Кормление кур-несушек в течение 6 месяцев позволило повысить яйценоскость на 21%, снизить эмбриональную смертность на 4%.

В ООО Спецхоз «Вишневский» (Воронежская область) применение ПроСтора в рационе свиней показало снижение кормозатрат на единицу прироста живой массы за счет лучшей усвояемости корма на 9,4% (табл. 1).

Таблица 1. Показатели применения пробиотического препарата ПроСтор в рационе свиней

Показатель	Единица измерения	Добавка ПроСтора (0,5 кг/т)	Контроль
Количество поросят	голов	156	161
Возраст поросят	дни	30–49	30–4920
Продолжительность опытного кормления	дни	20	20
Средний вес в начале опыта	кг/гол.	7,57	7,74
Средний вес в конце опыта	кг/гол.	16,27	15,14
Среднесуточный привес	кг/гол./сут.	0,435	0,370
Расход корма за опыт	кг/гол.	11,9	11,1
Среднесуточный расход корма на голову	кг/гол./сут.	0,595	0,555
Затрат корма на 1 кг привеса живой массы	кг	1,37	1,50
Экономическая эффективность	%	+9,4	

Использование препарата ПроСтор в кормлении КРС в опыте на телятах в ООО «Нива» (ОАО «Молочные компании “Зеленая долина”») показало увеличение среднесуточного привеса телят на 11,2% (табл. 2).

Таблица 2. Показатели применения препарата ПроСтор в рационе телят (117 кормодней)

Показатель	Контроль	Опыт
Поголовье на начало опыта, голов	12	12
Средняя живая масса при постановке, кг	85,25	79,83
Живая масса в конце опытного кормления, кг	185,50	191,25
Средний привес 1 теленка, кг	100,25	111,41
Суточный привес 1 теленка, кг	0,856	0,952
% к контролю	100	111,2

Известно, что пробиотические препараты стимулируют развитие кишечных бактерий, что ведет к включению азота (из аммиака и других источников) в белок бактериальных клеток, биомасса которых затем выделяется из организма с фекалиями.

Показано также, что и пребиотики способны снижать концентрацию аммония в фекалиях (Flickinger et al., 2003; Rehman et al., 2008). При этом влияние синбиотических препаратов на аммоний-азотный метаболизм в кишечнике связано со сдвигом выделения азота из мочи в фекалии (Heijnen, Beunen, 1997).

Это объясняется возрастанием синтеза бактериального протеина, вызывающего уменьшение всасывания в кишечнике азота, образованного из аммония. Косвенное значение такого влияния проявляется в уменьшении неприятного аммиачного запаха на животноводческих фермах и птицеводческих хозяйствах и имеет важное экологическое значение.

Снижение негативного пресса от повышенного содержания аммиака и сероводорода в животноводческих хозяйствах ведет к повышению качества жизни животных, что проявляется в дополнительных привесах путем опосредованного влияния на организм через обонятельную систему.

Такой эффект проявляет пробиотический препарат ПроСтор, биопленка бактерий которого устойчива к сохранению в условиях повышенной влажности, в проточной системе и биологически/экологически активна. Это показано в опыте по применению модификации ПроСтора без лекарственных растений (препарат Санвит-К) в свиноводческих стоках СПК Колхоз имени Горина (Белгородская область). Свиноводческий сток — это фекальные массы в периодическом проточе воды (рис. 2).



Рис. 2. Вид свиноводческого стока в СПК Колхоз имени Горина

Такие условия позволяют пробиотической биопленке, которая смешивается с фекалиями, снижать уровень аммиака за счет использования азота для своей жизнедеятельности и сероводорода за счет ингибирования развития анаэробов.

Одна только нормализация воздушной среды без применения каких-либо иных воздействий оказала явное положительное действие на рост и развитие свиней (рис. 3).

Таким образом, на различных животных убедительно показано, что новое поколение кормовых пробиотических препаратов в виде биопродукта на фито-носителе отличается высокой биологической активностью и перспективно для применения в рационах животных и для улучшения экологических показателей.



Рис. 3. Содержание аммиака (А) и сероводорода (Б) в воздухе производственного помещения и производственные показатели выращивания свиней в Колхозе имени Горина: средний вес 1 головы (В) и среднесуточный привес (Г)

ЛИТЕРАТУРА

Бондаренко В. М., Мацулевич Т. В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. С. 304–305.

Ушакова Н.А., Бродский Е.С., Козлова А.А., Нифатов А.В. Анаэробная твердофазная ферментация растительных субстратов с использованием *Bacillus subtilis* // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 1. С. 70–77.

Ушакова Н.А., Вознесенская В.В., Козлова А.А., Нифатов А.В., Самойленко В.А., Некрасов Р.В., Егоров И.А., Павлов Д.С. Выделение соматостатин-подобного пептида клетками *Bacillus subtilis* В-8130, кишечного симбионта дикой птицы *Tetrao urogallus*, и влияние бациллы на животный организм // Доклады Академии наук. 2010. Т. 434. № 2. С. 282–285.

Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Бобровская О.И., Павлов Д.С. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. 2012. № 1. С. 184–192; 4.

Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Мелешко Н.А., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Козлова А.А., Нифатов А.В. Влияние *Bacillus subtilis* на микробное сообщество рубца и его членов, имеющих высокие коэффициенты корреляции с показателями пищеварения, роста и развития хозяина // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 456–463.

Flickinger E.A., Schreijen E.M., Patil A.R., Hussein H.S., Grieshop C.M., Merchen N.R., Fahey G.C. Jr. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets // Journal of Animal Science. 2003. Vol. 81. No. 8. P. 2008–2018.

Heijnen M.L. A., Beynen A.C. Consumption of retrograded (RS3) but not uncooked (RS2) resistant starch shifts nitrogen excretion from urine to feces in cannulated piglets // The Journal of Nutrition. 1997. Vol. 127. No. 9. P. 1828–1832.

Kohli V., Rehman S., Rathlavath S., Agarwal D. Quorum sensing: survival strategy of microbes // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018. Vol. 7. No. 5. P. 165–172.

Rehman H., Böhm J., Zentek J. Effects of differentially fermentable carbohydrates on the microbial fermentation profile of the gastrointestinal tract of broilers // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2008. Vol. 92. No. 4. P. 471–480.

Highly efficient feed additives for animals on the basis of probiotic biofilm on phytocARRIER

Ushakova N.A.,¹ Pravdin V.G.,² Kravtsova L.Z.²

¹ A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russia;

² Scientific Technical Centre of Biotechnologies in Agriculture, Shebekino, Belgorod Oblast, Russia.

Abstract

Obtaining probiotic preparations in the form of a biofilm is a new direction in biotechnology. The process of solid-state cultivation of probiotic strains of *Bacillus subtilis* and the production of biofilms on a solid carrier (DBA ProStor synbiotic preparation, and its modification Sanvit-K) has been developed. The technology for producing feed additions imitates the vital conditions of intestinal microsymbionts and includes solid-state fermentation of beet pulp. The final product contains probiotic biomass, products of their metabolism, micro-sorbent (phytoparticles of beet pulp), prebiotics (beet pectins), as well as milk thistle and echinacea phytoparticles. The obtained data on the effectiveness of DBA ProStor and its modification was confirmed in extensive production trials.

Key words: probiotic, biofilm, prebiotic

УДК 636.934.2

Применение некоторых биологические активных веществ в рационах норок для повышения продуктивности

Балакирев Н.А., Гусельникова А.А., Любимова М.Ю.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: balakirev@mgavm.ru

Аннотация

Изучена эффективность применения антиоксиданта Эмидонол 20% и Витазар в рационе норок в период размножения и лактации. Была проанализирована динамика прироста живой массы щенков, сохранности молодняка перед отсадкой. Было показано положительное влияние на молодую норку антиоксиданта Эмидонол 20% и Витазар. Установлено положительное влияние антиоксиданта Эмидонол 20% и Витазар на репродуктивную функцию самки норки.

Ключевые слова: норки, антиоксидант, Эмидонол 20%, Витазар, самки основного стада, щенение, плодовитость, сохранность

Введение

Одной из важных задач в современном пушном звероводстве, от которого зависит успех работы отрасли, является кормление. На сохранность зверей и повышение продуктивности в первую очередь влияют качество кормовой базы и полноценность и сбалансированность питания. В настоящее время корма, поступающие в звероводческие хозяйства, в ряде случаев бывают недоброкачественными из-за нарушения условий их заготовки, переработки, хранения и транспортировки. Создание хорошего уровня кормления возможно, прежде всего, за счет поиска и производства более дешевых отечественных кормов и их рационального использования. В последние годы расширен спектр использования новых нетрадиционных кормовых средств, изучение их питательной ценности, определение норм скармливания. В связи со сложностями с кормами для повышения полезных качеств в пушном звероводстве применяются кормовые добавок и биологически активные вещества, которые способ-

ны компенсировать недостаток питательных веществ и повышать коэффициент полезного действия питательных веществ, а также способствовать нейтрализации токсических веществ в корме, и в результате все это будет способствовать повышению продуктивности клеточных пушных зверей. К таким добавкам относятся и антиоксиданты.

Антиоксиданты — вещества, препятствующие окислительным процессам и накоплению свободных радикалов в организме. Однако естественная антиоксидантная система организма часто оказывается перегруженной — это состояние называется окислительным стрессом.

Применение антиоксидантов в рационах может предотвращать окислительный стресс и оказывает положительное влияние на продуктивные качества и состояние здоровья зверей.

Эмидонол 20% является новым водорастворимым антиоксидантным комплексом на основе эмицидина и мельдония. Механизм действия Эмидонола 20% заключается в специфическом влиянии на энергетический обмен посредством снижения интенсивности перекисного окисления липидов в мембранах клеток и связывания свободных радикалов, что приводит к увеличению степени энергизации клеток.

Витазар — биологически активное вещество, которое обладает природными антиоксидантными свойствами. В препарате Витазар содержится около 70% витамина Е в α -форме, который способствует предотвращению перекисного окисления за счет сильного антиоксидантного эффекта. Витазар богат полиненасыщенными жирными кислотами (линолевая, линоленовая, пальмитиновая, стеариновая, эруковая), неомыляемыми углеводородами (в частности, стеролы, токоферолы, монотриенолы, *n*-спирты (октакозанол)), а также большим количеством жирорастворимых витаминов и микроэлементами (*K и Ca*).

Материал и методы

Исследования проводились в ОАО «Племенной зверосовхоз Салтыковский» (Московская область) на норках (*Neovison vison*) клеточного разведения. Были сформированы по четыре группы норок аналогов по происхождению, живой массе и возрасту. Для испытания препарата Эмидонол 20% на норках были сформированы группы по 30 особей самок основного стада в каждой, а для испытания препарата Витазар по 20 самок (далее по тексту не говорится о самцах).

Препарат Эмидонол 20% вводился норкам в кормосмесь один раз в пять дней. Животные первой группы (контроль) получали порцию нативного корма. Животные второй, третьей и четвертой группы получали 0,1; 0,2 и 0,3 мл препарата Эмидонол 20% с кормосмесью соответственно.

Препарат Витазар вводили второй, третьей и четвертой группе 3 раза в неделю в состав кормосмеси в дозе 1,8; 3,3 и 5,0 мл на голову соответственно. Первая группа являлась контрольной.

Добавки в рацион норок начали вводить за месяц до начала гона и продолжали непрерывно до отсадки.

Результаты исследований были обработаны с помощью метода статистической обработки данных с помощью *t*-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Главным критерием для оценки антиоксидантных добавок Эмидонол 20% и Витазар являлось влияние препарата на воспроизводительную функцию самок норок основного стада.

Введение препаратов в рацион за месяц до гона оказало положительное влияние и способствовало снижению отхода щенков.

При применении антиоксидантного комплекса Эмидонол 20% наблюдалось снижение количества пропустовавших самок во всех группах. Так, в контрольной группе не щенились 13,5% самок, во второй и третьей группах — по 10%, а в четвертной группе — 6,5% самок (табл. 1).

Таблица 1. Результаты щенения самок норки при применении антиоксидантного комплекса Эмидонол 20%

Группа	N	Родилось щенков, гол.	Пало щенков, гол.	Плодовитость, гол.	Выход щенков на самку, гол.	Сохранность, %.
I (контроль)	30	185	37	6,17±0,48	4,93±0,52	80,00
II (0,1 мл/гол.)	30	179	23	6,17±0,46	5,38±0,43	87,15
III (0,2 мл/гол.)	30	181	17	6,03±0,44	5,47±0,47*	90,61*
IV (0,3 мл/гол.)	30	188	8	6,27±0,36	6,00±0,33*	95,74**

* $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,05$.

Было установлено, что в группах, где применялся препарат Эмидонол 20%, наблюдается повышение сохранности щенков в сравнении с контролем: во второй группе на 7,2%, в третьей — на 10,6% и в четвертой группе — на 15,7%.

Падеж в контрольной группе оказался значительно выше и составил 37 щенков. Показатель смертности снижается с повышением концен-

трации препарата: во второй группе — 23, в третьей — 17 голов, и в четвертой он был наименьшим и составил 8 голов, что на 29 меньше, чем в контрольной группе. Количество павших щенков до 3-го дня в четвертой группе снизилось почти в 5 раз в сравнении с контролем и составило 6 голов. Такая же тенденция наблюдается и с 3-го дня до отсадки: падеж в третьей группе составил 3 головы, в четвертой — 2, в то время как в контроле падеж был 9 голов.

При применении Витазара была отмечена тенденция к повышению плодовитости норок в третьей группе, где препарат вводился в составе кормосмеси в дозе 3,3 мл на голову.

Плодовитость самок в третьей группе была выше на 0,6 гол., во второй и четвертой группах на 0,4 гол., чем в контрольной группе (табл. 2).

Таблица 2. Результаты щенения самок норки при применении препарата Витазар

Группа	N	Родилось щенков, гол.	Пало щенков, гол.	Плодовитость, гол.	Выход щенков на самку, гол.	Сохранность, %
I (контроль)	20	112	16	5,6±0,45	4,8±0,49	91,4
II (1,8 мл/гол.)	20	110	6	5,8±0,44	5,2±0,44	94,5
III (3,3 мл/гол.)	20	118	8	6,2±0,40	5,8±0,38	93,2
IV (5,0 мл/гол.)	20	111	6	5,8±0,37	5,5±0,35	92,8

Уровень молочности самок в третьей группе был выше уровня в контрольной на 85,3 г. Во второй группе молочность была несколько выше, чем в контрольной группе, — на 12,6 г. Наименьший результат был получен в четвертой группе — 623,9 г, что меньше, чем в контрольной, второй и третьей группе на 21,6; 72,1 и 106,9 г соответственно.

Выход молодняка в группах, где применялся препарат был выше, чем в контрольной: во второй — на 0,4 гол., в третьей — на 1 гол., в четвертой — на 0,7 гол.

Сохранность щенков на момент отсадки во всех группах находилась в пределах нормы и не имела существенного различия. В контрольной группе сохранность молодняка была самая низкая — 91,4%, а во второй, третьей и четвертой выше на 3,1; 1,8 и 1,4% соответственно.

Заключение

Антиоксидантные препараты Эмидонол 20% и Витазар оказывают положительное действие на самок основного стада в период воспроизводства и лактации. При применении антиоксидантного комплекса Эмидонол 20% у норок, по сравнению с животными контрольной группы, достоверно установлено повышение выхода щенков на самку и сохранность щенков. Препарат Витазар способствует повышению плодовитости и молочности самок норок основного стада, выходу и сохранности молодняка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балакирев Н.А. Нетрадиционные корма в рационах клеточных пушных зверей // Актуальные проблемы зоотехнии: сб. трудов. М.: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2009.
2. Балакирев Н.А. Кормление норок. монография. М.: Научная библиотека, 2015. 248 с.
3. Балакирев Н.А., Багдонас И.И. Эффективность использования аргусита в рационах норок // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. 2016. № 11. С. 48–61.
4. Демина Т.М., Растимешина О.В., Тинаева Е.А. Повышение эффективности клеточного звероводства на основе применения биологически активных субстанций. Сообщение 1. Поддержание физиологического статуса и повышение продуктивности норок на основе использования L-карнитина // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2018. № 6. С. 64–68.
5. Муромцева Я.М., Малашко В.В. Влияние препаратов Фоспренил и Гамавит на организм норок // Вопросы зоотехнии и ветеринарной медицины. Калининград: ФБОУ ВПО «КГТУ», 2012. С. 47–52.

The use of biological active substances in mink ration and effect on their productivity

Balakirev N.A., Guselnikova A.A., Lyubimova M.Y

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

We studied the effectiveness of the use of the antioxidant Emidonol 20% and Vitazar in the mink ration in the period of reproduction and lactation. The

dynamics of the increase in body weight of puppies and the safety of young animals before jigging has been analyzed. A positive effect of antioxidant Emidonol 20% and Vitazar on young minks has been shown. The positive effect of the antioxidant Emidonol 20% and Vitazar on the reproductive functions of the female mink was also established.

Key words: mink, antioxidant, Emidonol 20%, Vitazar, females of the main herd, puppy, fecundity, safety

УДК 636.5.087.8

Биохимический маркер генетически обусловленной мясной продуктивности птиц на эмбриональной стадии

Титов В.Ю.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина», Москва, Россия;

²ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Московская обл., Россия

E-mail: vtitov43@yandex.ru

Аннотация

Эмбрионы яичных и мясных форм птиц не различаются по интенсивности синтеза оксида азота, но имеют большое различие по интенсивности его окисления до нитрата. Различия достигают более двух порядков и предопределены только генетически. Они не зависят от пола эмбриона и особенностей питания несушек. Таким образом, мы имеем очень чувствительный и не зависящий от внешних факторов маркер мясной продуктивности, проявляющийся на эмбриональной стадии развития.

Ключевые слова: мясная продуктивность, эмбрион, оксид азота

Качества, определяющие мясную продуктивность птицы детерминированы, прежде всего, генетически. Но для успешной селекции необходимо знать биохимические механизмы повышения мясной продуктивности и их генетическую обусловленность, то есть иметь какие-то биохимические или морфологические маркеры предрасположенности к интенсивному развитию мышечной ткани. Желателен такой маркер, который однозначно показывает наличие генетической предрасположенности и тесно коррелирует с ней.

Гистологические данные показывают, что миогенез у птиц определенного вида идет с одинаковой скоростью, независимо от направления продуктивности. Разница в массе мышц определяется числом волокон, их толщиной. Причем разница по этим показателям между мясными и

яичными формами начинает проявляться уже на постэмбриональной стадии [1]. Но на эмбриональной стадии действуют различные биохимические факторы, обуславливающие величину прироста мышечной массы в постэмбриональный период. Генетически, по-видимому, предопределены синтез этих факторов, а также наличие их мишеней и восприимчивость последних. По данным ряда исследователей, деятельность этих факторов связана, в частности, с оксидом азота – универсальным клеточным медиатором, синтезирующимся из аргинина под действием фермента NO-синтазы [2, 3]. Но, в связи с невозможностью определения всех метаболитов NO в живых тканях, нет возможности контроля его метаболизма и корреляции последнего с физиологическими процессами. В основном об эффекте NO судили по эффектам блокаторов NO-синтазы или экзогенного введения соединений – доноров NO [2, 3].

Благодаря разработанному нами ферментному сенсору, позволяющему оперативно оценивать концентрацию всех имеющихся в живых тканях нитро- и нитрозосоединений, в частности, соединений – доноров NO и конечных продуктов окисления NO нитратов [4,5], были установлены следующие закономерности. Интенсивность синтеза оксида азота во всех эмбрионах, принадлежащих к одному виду, примерно одинаковая. Но различается интенсивность окисления NO до нитрата. Она интенсивна в эмбрионах мясных пород, линий и кроссов. Здесь окислению подвергается практически весь оксид азота, синтезированный в эмбрионе. У яичных пород это окисление незначительно. Оксид азота накапливается в эмбрионе в составе соединений – доноров: нитрозотиолов, различных нитрозильных комплексов железа. Разница в интенсивности окисления эмбрионального NO между мясными и яичными формами – более двух порядков. Это было показано на более чем 50 породах, линиях и кроссах пяти видов птиц [6, 7].

Показано, что селекция в сторону увеличения мясной продуктивности всегда сопряжена с интенсификацией эмбрионального окисления NO [7, 8].

Интенсивное окисление начинается на вторые–третьи сутки развития эмбриона, когда закладываются миотомы, и продолжается практически весь эмбриональный период. Анализ состава эмбриональных тканей показал, что нитрат в эмбрионах мясных форм накапливается преимущественно в мышечной ткани. Из нее нитрат поступает в аллантоис. Накопление нитрата в других тканях незначительно. У цыплят после вывода содержание нитро- и нитрозосоединений в тканях резко снижается, и разница между мясными и яичными формами по этому

показателю исчезает. Таким образом, с мясной продуктивностью коррелирует именно эмбриональное окисление оксида азота.

Применение нитроаргинина – блокатора NO-синтазы – способствовало снижению содержания доноров NO и нитрата в эмбрионе. Но снижение содержания доноров NO даже на 70% достоверно не сказывалось на жизнеспособности эмбрионов и на их живой массе. Следовательно, в птичьих эмбрионах интенсивно продуцируется оксид азота и накапливается в составе соединений – доноров в количестве, многократно превышающем физиологические потребности эмбриона. Для чего в таком случае NO накапливается в эмбрионе? Только для того, чтобы быть субстратом в процессе, коррелирующем с интенсивностью развития мышц, проявляющейся на постэмбриональной стадии? Экзогенно вводимые в эмбрион соединения – доноры оксида азота – окислялись до нитрата с такой же интенсивностью, как и эндогенные доноры NO. Следовательно, интенсивность окисления действительно обусловлена, как мы предполагаем, наличием или состоянием мишени NO [9, 10].

Таким образом, селекция в сторону увеличения мясной продуктивности приводит к качественному изменению в эмбриональном метаболизме оксида азота. Дальнейшие исследования должны раскрыть механизм этих изменений, имеющий очевидно генетическую природу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титов В.Ю., Фисинин В.И., Борхунова Е.Н., Кондратов Г.В. Взаимосвязь эмбрионального метаболизма оксида азота и морфологических особенностей взрослых особей кур // Российская сельскохозяйственная наука. 2016. № 4. С. 64–68.
2. Cazzato D., Assi E., Moscheni C., Brunelli S., De Palma C., Cervia D., Perrotta C., Clementi E. Nitric oxide drives embryonic myogenesis in chicken through the upregulation of myogenic differentiation factors // *Experimental Cell Research*. 2014. Vol. 320. No. 2. P. 269–280.
3. Lee K.H., Baek M.Y., Moon K.Y., Song W.K., Chung C.H., Ha D.B., Kang M.S. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269. No. 20. P. 14371–14374.
4. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. Способ определения нитрозосоединений и нитрита в биообъектах. Патент РФ № 2395096, рег. 20.07.2010.
5. Titov V., Petrenko Yu., Vanin A., Stepuro I. Detection of nitrite and nitrosocompounds in chemical systems and biological liquids by the calorimetric method // *Biophysic*s. 2010. Vol. 55. No. 1. P. 77–86.

6. Titov V.Yu., Dolgorukova A.M., Fisinin V.I., Borkhunova Ye.N., Kondratov G.V., Slesarenko N.A., Kochish I.I. The role of nitric oxide (NO) in the body growth rate of birds // *World Poultry Science Journal*. 2018. Vol. 74. No. 4. P. 675–686.

7. Titov V.Yu., Vinnikova E.Z., Akimova N.S., Fisinin V.I. Nitric oxide (NO) in bird embryogenesis: physiological role and ability of practical use // *World's Poultry Science Journal*. 2012. Vol. 68. No. 1. P. 83–95.

8. Винникова Э.З., Титов В.Ю. Определение фенотипически невыраженных форм страуса // *Птицеводство*. 2008. № 12. С. 33–34.

9. Долгорукова А.М., Титов В.Ю., Петров В.А., Осипов А.Н., Слесаренко Н.А., Кочиш И.И. Механизм специфических эмбриональных эффектов оксида азота // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018. Т. 165. № 5. С. 577–582.

10. Титов В.Ю., Долгорукова А.М., Вертипрахов В.Г., Иванова А.В., Осипов А.Н., Слесаренко Н.А., Кочиш И.И. Синтез и метаболизм оксида азота (NO) в птичьем эмбрионе и в крови взрослой птицы // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019. Т. 168. № 9. С. 287–291.

Biochemical marker of genetically determined meat productivity of poultry at the embryonic stage

Titov V.Yu.^{1,2}

¹K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;

²Federal Scientific Centre 'All-Russian Poultry Research and Technological Institute' of the Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia

Abstract

Embryos of egg and meat type chicken forms do not differ in the intensity of synthesis of nitric oxide, but have a large difference in the intensity of its oxidation to nitrate. Differences reach more than two orders and are predetermined only genetically. They are independent of the sex of the embryo and the nutritional characteristics of the laying hens. Thus, we have a very sensitive marker for meat productivity independent of external factors, which manifests itself at the embryonic stage of development.

Key words: meat productivity, embryo, nitric oxide

УДК 619:616.98:579-078:636.596

Экологическая оценка микробиоты организма сизых голубей (*Columba livia*) в условиях радионуклидного загрязнения Брянской области

Кочиш И.И., Бутова И.В., Содбоев Ц.Ц., Щукин М.В., Дельцов А.А.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: vetbio2013@mail.ru

Аннотация

Целью работы является оценка микробиоты *Columba livia* в условиях радиоактивного загрязнения Брянской области. Поскольку такой научный анализ был проведен впервые, было установлено, что общее количество условно-патогенных микроорганизмов, принадлежащих к грамотрицательным палочкам семейства *Enterobacteriaceae*, было увеличено в организме этих синантропных птиц. Нарушение микробиоты организма *Columba livia* может вызвать инфекционное заболевание, характеризующееся появлением ассоциации условно-патогенных микроорганизмов *Citrobacter* и *Klebsiella*.

Ключевые слова: сизый голубь, микробиота, радионуклиды, радиационный фон, цезий-137

Введение

Микробиота животных – это сложная система, отличающаяся не только чрезвычайной многокомпонентностью, но и количественным разнообразием входящих в нее представителей микрофлоры. Природным резервуаром возбудителей многих инфекционных болезней, представляющих опасность для человека и животных, являются дикие птицы, следовательно, и синантропные птицы (воробьи, голуби, вороны и др.) оказывают определённое влияние на эпидемиологическую и эпизоотическую ситуацию в местах своего обитания [1].

В последние годы изменилась этиологическая структура инфекционных заболеваний человека и животных. Многочисленные исследования

подтолкнули ученых к мнению, что эти изменения связаны с постоянной эволюцией бактерий и вовлечением в патологические процессы условно-патогенных микроорганизмов, которые в качестве комменсалов присутствуют в составе нормальной микрофлоры, а при различных эндогенных и экзогенных воздействиях регистрируются как этиопатогены. Обладая удивительной биологической и экологической пластичностью, условно-патогенные микроорганизмы способны к широкому распространению во внешней среде и длительной персистенции в организме животных [2, 6].

Представители нормальной микрофлоры выполняют физиологически важную функцию поддержания постоянства внутренней среды организма, принимают участие в формировании иммунобиологической реактивности макроорганизма. Участвующие в развитии дисбактериоза патогенные и условно-патогенные микроорганизмы могут являться источниками инфекции.

На территориях, загрязненных радионуклидами после аварии на Чернобыльской АЭС, иммунологическая резистентность животных к возбудителям инфекций под воздействием ионизирующей радиации понижается [3], и условно-патогенная микрофлора организма приобретает высокий уровень адаптивных возможностей. В связи с вышеизложенным возникла необходимость проведения бактериологического мониторинга среди синантропных птиц на территориях, загрязненных радионуклидами.

Цель исследования – оценить микробиоту организма сизых голубей, *Columba livia* (Gmelin, 1789), Новозыбковского района Брянской области.

Материалы и методы

Отлов *Columba livia* проводили в селе Верещаки Новозыбковского района Брянской области в октябре 2016 г. Определение микробного пейзажа внутренних органов голубей (зоб, кишечник, почки, сердце, печень и легкие) проводили общепринятыми методами бактериологического исследования с посевом на питательные среды с последующей идентификацией выделенной культуры микроорганизмов [5]. Выделение микробных комплектов проводили на питательной среде Плоскирева.

В целях дифференциации микробных культур проводили молекулярно-генетические исследования, а также изучали биохимические свойства с применением среды Клиглера и системы индикаторных бумажек (СИБ) для идентификации микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, ранее разработанной Горьковским НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР. Радиационный фон местности измеряли дозиметром ДРГ-01Г1 на высоте 1 м.

Результаты и обсуждение

Необыкновенная привязанность сизого голубя к местам своих гнездовых создаёт условия для хронического воздействия многочисленных факторов окружающей среды на этих птиц и делает их подходящим объектом для бактериологического мониторинга на территориях, загрязнённых радионуклидами.

Брянская область относится к числу территорий России, наиболее пострадавших от Чернобыльской аварии. Радиационный фон на территории села Верещаки находится в пределах естественного. Средние значения мощности экспозиционной дозы равны $17,3 \pm 0,52$ мкР/ч.

Установлено, что суммарная удельная активность Cs-137 в почвенных срезах Новозыбковского района составила 4135,4 Бк/кг. Плотность загрязнения по Cs-137 равна 34 Ки/км² (1,2 МБк/м²). Очевидно, что ареал голубей находится в зоне отселения и стоит отметить, что максимальная концентрация Cs-137 сосредоточена в 5-сантиметровом слое почвы. Расчет плотности поверхностного загрязнения продемонстрировал, что окрестности села Верещаки располагаются в зоне отселения.

Columba livia питаются осыпавшимися семенами сорных и культурных растений. Известно, что корневая и вегетативная системы растений содержат максимальную удельную активность радионуклидов, а репродуктивные части – минимальную. *Columba livia* собирают на земле зерно, причем могут выкапывать его с глубины до 2 см, что зачастую приводит к попутному заглатыванию с почвой Cs-137. В зобе *Columba livia* при вскрытии нами обнаружены песчинки, камешки и следовые количества почвы. По данным орнитологов, склёвывание почвы обеспечивает формирование и поддержку у *Columba livia* кишечной микрофлоры.

Бактериологическим исследованием из 60 проб внутренних органов *Columba livia* (зоб, кишечник, печень, сердце, легкие и почки) были выделены микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, которые представлены 6 родами – *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Hafnia* и *Salmonella arisona*.

Кроме культур семейства *Enterobacteriaceae*, нами выявлены грамположительные бактерии рода *Staphylococcus*. По литературным данным [4], все обнаруженные в органах *Columba livia* микроорганизмы относятся к возбудителям бактериальных заболеваний человека и животных.

В октябре 2016 г. нами изолированы из полости зоба бактерии *Salmonella arisona* у 25% голубей. Бактерии *Salmonella* – одни из самых опасных микроорганизмов в семействе энтеробактерий. В литературе приведены сведения о длительном выживании сальмонелл в воде и почве. В полость зоба птиц микроорганизмы попадают с кормом, водой и

воздухом. По всей видимости, низкое значение pH среды полости зоба *Columba livia* и присутствие постоянной микрофлоры препятствовали проникновению сальмонелл в желудочно-кишечный тракт.

Наибольшее значение среди микробиоценозов имеет микробиота желудочно-кишечного тракта, так как нарушения в ее составе наиболее часто отягощают течение других заболеваний и оказывают влияние на адаптационные реакции организма животных. В кишечнике отловленных *Columba livia* доминировали бактерии рода *Citrobacter*, частота встречаемости которых составила 75%. Несколько реже, наряду с *Citrobacter*, у обследованных *Columba livia* обнаружались микроорганизмы родов *E. coli* (50%), *Enterobacter* (25%) и *Klebsiella* (25%).

В ходе исследования в 75% случаях из почек *Columba livia* нами выделены культуры *Citrobacter*. Общеизвестно, что почки здоровых животных стерильны. Совершенно очевидно, что дислокация микрофлоры в почках указывает на возможность распространения *Columba livia* возбудителя *Citrobacter* в окружающей среде.

Бактерии рода *Citrobacter* у 50% голубей контаминировали зоб, печень и легкие, в этих же органах у 25% особей мы обнаружили *Klebsiella*, что свидетельствует о снижении защитных сил микроорганизма и о течении в организме птицы генерализованного процесса. По-видимому, инфекционная патология у *Columba livia* связана с воздействием на их организм ассоциации двух этиологических агентов – рода *Citrobacter* и *Klebsiella*. Каждый из выделенных агентов обладает целым набором биологических характеристик, и их сочетание определяет высокий вирулентный потенциал патогенов. Как правило, такое заболевание заканчивается истощением и гибелью птицы.

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что в условиях радионуклидного загрязнения территорий Брянской области ослабление иммунологической резистентности организма *Columba livia* приводит к возникновению у них септического процесса, вызванного условно-патогенными бактериями родов *Citrobacter* и *Klebsiella*.

Заключение

Таким образом, в условиях радионуклидного загрязнения территорий Новозыбковского района Брянской области у *Columba livia* установлено увеличение общей численности условно-патогенных микроорганизмов, относящихся к грамотрицательным палочкам семейства *Enterobacteriaceae*, что позволяет рассматривать бактерионосительство как фактор риска развития патологии. Нарушение микробиоты организма птиц вызывает у них инфекционное заболевание, которое ха-

рактируется появлением ассоциации условно-патогенных микробов *Citrobacter* и *Klebsiella*. Для уточнения патогенности выделяемых бактерий и ответных реакций организма *Columba livia* необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлаков В.А., Родионова В.Б., Интизаров М.М., Бурлаков С.В. Проблемы борьбы и профилактики желудочно-кишечных болезней молодняка животных // Ветеринарная медицина. 2002. № 1. С.6–7.
2. Бухарин О.В., Дерябин Д.Г. Экологическая детерминированность маркеров персистенции микроорганизмов // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997. № 4. С. 60–63.
3. Лысенко Н.П., Пастернак А.А., Рогожина Л.В., Павлов А.Г. Ведение животноводства в условиях радиоактивного загрязнения М.: Лань, 2005. 240 с.
4. Джупина С.И. Факторные инфекционные болезни животных // Ветеринария. 2001. № 3. С.6–7.
5. Коровин Р.Н., Зеленский В.П., Грошева Г.А. Лабораторная диагностика болезней птиц: Справочник. М.: Агропромиздат. 1989. 256 с.
6. Уиттекер Р. Сообщества и экосистемы / Пер. с англ. М., 1980: Прогресс. 217

Ecological assessment of the microbiota in the organism of blue pigeons (*Columba livia*) under the conditions of radionuclide contamination of the Bryansk Region

Kochish I.I., Butova I.V., Sodboyev Ts.Ts., Shchukin M.V., Deltsov A.A.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

The article aims to assess the microbiota of *Columba livia* under the conditions of radioactive contamination of the Bryansk Region. Because such a scientific analysis was done for the first time, it was established that the total number of opportunistic microorganisms belonging to Gram negative rods of the family *Enterobacteriaceae* was increased in the organism of these synanthropic birds. Disturbance of the microbiota of the *Columba livia*

organism can cause an infectious disease characterized by the emergence of an association of opportunistic microbes *Citrobacter* and *Klebsiella*.

Key words: rock dove, microbiota, radionuclides, background radiation, cesium-137

УДК 575.224.46+577

Оценка цитогенетического эффекта внутреннего облучения новорожденных телят в Калужской области

Кочиш И.И., Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Дубасов В.В., Тележенков А.П., Кубатин И.А., Гушин В.В., Заболотнов Г.О.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: vetbio2013@mail.ru

Аннотация

Антропогенное загрязнение окружающей среды способствует росту мутационного процесса и приводит к изменению генетических параметров живых организмов. Система крови одной из первых реагирует на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, поэтому цитологический анализ крови позволяет судить о состоянии организма в различных условиях загрязнения ареала. Одним из наиболее информативных и быстрых методов изучения цитогенетического повреждения является микроядерный тест, основанный на подсчете количества клеток по микроядрам. Хроническое облучение приводит к увеличению доли микроядер в эритроцитах новорожденных телят по сравнению с животными контрольной группы, которые содержались в экологически чистых условиях Тульской области. Известно, что при развитии плода печень плода является кроветворным органом и, по-видимому, в процессе дифференцировки эритроцитов цезий-137 приводит к повреждению генетического материала, что приводит к появлению в них микроядер.

Ключевые слова: телята, цезий-137, Чернобыльская авария, микроядра, эритроциты, дозиметр, биодозиметрия, полимелия

Введение

Изучение нестабильности генома клеток организма после действия ионизирующей радиации в дозах, встречающихся в природных условиях, а также исследование возможности наследования радиационно-индуцированных изменений представляются актуальной проблемой современной молекулярной радиобиологии.

Радиационно-индуцированная нестабильность генома является следствием неточной репарации повреждений структуры генома, так как радиация может менять его доступность для системы регуляции экспрессии генов.

Последствия Чернобыльской аварии для пострадавших регионов РФ свидетельствуют, что влияние этой катастрофы еще длительное время будет сказываться на природных экосистемах, здоровье животных и населении этих территорий, которые стали заложниками сложившейся ситуации.

Цель исследования – оценить цитогенетический эффект хронического инкорпорированного облучения у новорожденных телят в Калужской области.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать радиационный фон местности.
2. Определить плотность радиоактивного загрязнения территории.
3. Провести количественную оценку цитогенетических нарушений периферической крови новорожденных телят.

Материалы и методы

Объект исследования – телята возрастом от 3 до 7 суток, живой массой около 30 кг, голштинизированной породы.

Радиационный фон измеряли дозиметром СРП 68-01. Забор крови проводили в соответствии с методическими указаниями в ОАО «Агрокомплекс Хвастовичский» Калужской области. Эпизоотологическая обстановка по инфекционным заболеваниям в хозяйствах благополучна.

Цитогенетический анализ крови проводился на кафедре радиобиологии. Под световым микроскопом «Биолам Л-2011» при 1000-кратном увеличении анализировали эритроциты. Эритроциты учитывали зрелые, достаточно прокрашенные, не перекрывающие друг друга, и только те, у которых четко видны границы клетки.

В качестве цитогенетического параметра нестабильности генома была выбрана частота встречаемости микроядер. Микросъемку проводили цифровой камерой-окуляром.

Полученные данные были подвергнуты математической и статистической обработке с помощью пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft).

Результаты и обсуждение

В Калужской области, климатогеографическая характеристика которой представлена в таблице 1, наиболее пострадавшими районами являются Ульяновский, Хвастовичский и Жиздринский.

Таблица 1. Климатогеографическая характеристика Калужской области

Доминирующие типы почвы	Дерново-подзолистые
Климат	Умеренно-континентальный
Средняя температура зимой, °С	-7; -8
Средняя температура летом, °С	+14; +15
Влажность, мм/год	610–670

Данные радиационного фона местности на изучаемых площадках не превышают допустимый уровень и составляют $15,0 \pm 3,0$ мкР/ч. Снижение радиационного фона происходит за счет физического распада цезия-137 ($T_{1/2} = 30$ лет) и его вертикальной миграции в почвах (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация цезия-137 в почвенных горизонтах

Слой почвы, см	Удельная активность	
	Бк/кг	%
0–5	$114,9 \pm 15,1$	34,6
5–10	$105,3 \pm 11,6$	32,0
10–20	$111,9 \pm 14,0$	33,4

Львиная доля суммарной удельной активности приходится на верхние десятисантиметровые горизонты, и свидетельствует о медленной вертикальной миграции цезия-137 в почвенном профиле. Показано, что в почвенных срезах суммарная удельная активность цезия-137 составила 332,12 Бк/кг. Плотность поверхностного загрязнения в Калужской области составила 3,0 Ки/км². Таким образом, основным дозообразующим радионуклидом на исследуемых территориях является цезий-137.

Цезий-137 легко проникает через плаценту и накапливается в развивающемся организме.

В ОАО «Агрокомплекс Хвостовичский» в 2019 г. родился теленок с врожденным заболеванием – полимелия, которая выражается наличием лишней конечности. Установлено, что недоразвитая конечность у 7-суточного теленка располагается на правом предплечье и включает в себя практически все анатомические структуры дистального (акроподия и метаподия) и среднего звена грудной конечности (рис 1.).



Рис. 1. Полимелия телянка

Микроядерный тест используется в радиационной биодозиметрии для количественной оценки воздействия ионизирующего излучения на повреждения ДНК. Микроядра (МЯ) – это небольшие, округлые хроматинсодержащие интерфазные структуры, обнаруживаемые в цитоплазме клеток (*рис. 2*).

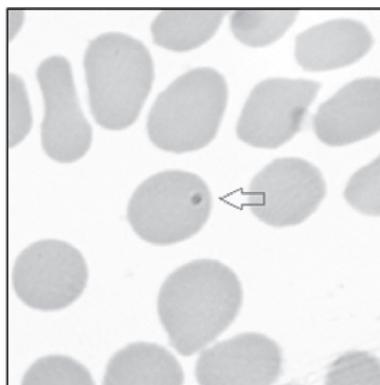


Рис. 2. МЯ в эритроците новорожденного телянка

Анализ периферической крови новорожденных телят Калужской области выявил, что на 1000 эритроцитов приходится $0,26 \pm 0,04\%$ ($CV \approx 21\%$) МЯ. Данные наших исследований в экологически благоприятном районе Тульской области свидетельствуют о незначительной частоте встречаемости МЯ – $0,05 \pm 0,01\%$ ($CV \approx 20\%$; табл.3.). Низкие уровни коэффициентов вариации указывают на однородность признака и подтверждают значимость наших результатов.

Таблица 3. Частота встречаемости эритроцитов с МЯ у телят

Регион	МЯ, %	CV, %
Калужская обл.	$0,27 \pm 0,04^*$	21
Тульская обл.	$0,05 \pm 0,01$	20

* $p \leq 0,05$

Таким образом, мы наблюдаем увеличение числа клеток, содержащих хромосомные аберрации.

Данные литературы свидетельствуют, что печень аккумулирует цезий-137. В эмбриональный период печень является местом кроветворной дифференцировки и, по всей видимости, цезий-137 приводит к повреждению генетического материала в развивающихся клетках крови. Генетические нарушения на уровне популяции клеток могут предшествовать развитию патологии.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что уровень эритроцитов с МЯ в периферической крови новорожденных телят повышается. Это свидетельствует об интенсификации процесса нарушения деления клеток и эндомутагенеза, связанных с радионуклидным поражением территорий Калужской области.

Заключение

1. Радиационная обстановка в Калужской областях определяется как естественными радиационными факторами, так и присутствующими в окружающей среде искусственными радионуклидами. Мощность экспозиционной дозы на площадках ОАО «Агрокомплекс Хвостовичский» составила $15,0 \pm 3,0$ мкР/ч;

2. В Калужской областях плотность поверхностного радиоактивного загрязнения почвы $3,0$ Ки/км².

3. В эритроцитах крови новорожденных телят ОАО «Агрокомплекс Хвостовичский» встречаемость МЯ составила $0,27 \pm 0,04$, это свиде-

тельствует о дестабилизации генетического аппарата ионизирующим излучением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Калемениев С.А., Волкова А.А. Влияние витаминных комплексов «Тривит» (Россия) и «Мультивит + Минералы» (Германия) на клинико-биохимические показатели крови коров в условиях радиоактивного загрязнения Плавского района Тульской области // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 6. С.94–99.

2. Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Пак В.В. Клинико-биохимические параметры крови коров в пастбищный период в зоне экологического влияния аварийных выбросов Чернобыльской АЭС // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. № 1. С.74–80.

Assessment of the cytogenetic effect of internal irradiation of newborn calves in the Kaluga Region

Kochish I.I., Shchukin M.V., Sodboyev Ts.Ts., Dubasov V.V., Telezhenkov A.P., Kubatin I.A., Gushchin V.V., Zabolotnov G.O.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

Anthropogenic environmental pollution contributes to the growth of the mutation process and leads to a change genetic parameters of living organisms. The blood system is one of the first to respond to the effects of adverse environmental factors, therefore, a cytological analysis of the blood allows you to judge the state of the body in various conditions of pollution of the range. One of the most informative and quick methods for studying cytogenetic damage is a micronucleus test based on counting the number of cells by micronuclei. Chronic radiation exposure leads to an increase in the proportion of micronuclei in the red blood cells of newborn calves compared with animals of the control group, which were kept in environmentally friendly conditions of the Tula Region. It is known that during fetal development, the fetal liver is a hematopoietic organ and, apparently, in the process of differentiation of erythrocytes, cesium-137 leads to damage to genetic material, resulting in the appearance of micronuclei in them.

Key words: calves, cesium-137, Chernobyl accident, micronuclei, red blood cells, dosimeter, biodosimetry, polymelia

УДК 638.12:591.557.8

Особенности микробиоты кишечного тракта медоносных пчел (*Apis mellifera*) в условиях Тульской области

Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Федоров Д.А., Булгаков А.В., Мартынова А.В.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: vetbio2013@mail.ru

Аннотация

Микробиоценозы кишечного тракта *Apis mellifera* в биогеохимической провинции антропогенного происхождения Плавского района Тульской области представлены доминантными стафилококками, стрептококками, кишечной палочкой и дополнительными таксонами: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Candida* и *Fusarium*. Установлено, что ареал пчел Суворовского района находится в чистой зоне, и наиболее распространенными таксонами пищеварительной системы являются стафилококки, стрептококки, кишечная палочка, энтеробактеры, энтерококки, а дополнительным является цитробактер.

Ключевые слова: пчелы, микроорганизмы, радионуклиды, радиация, Тульская область, микробиота, кишечный тракт

Введение

Длительное техническое развитие страны привело Россию к экологическому кризису. Несмотря на принимаемые меры, экологическая опасность граждан постоянно снижается, что наиболее остро проявляется в ухудшении качества среды обитания человека, ведущей к снижению продолжительности жизни, увеличению смертности и ухудшению генофонда населения, в деградации природных ресурсов, распространении радиоактивного загрязнения.

Состояние окружающей природной среды в России крайне неблагоприятно, а в некоторых регионах (их число постоянно растёт) приобрело характер экологического бедствия. Экономический ущерб от загрязнения природы равен примерно половине национального дохода России.

В результате хозяйственной деятельности человека во внешнюю среду наряду со многими загрязнителями поступают всё возрастающее количество солей тяжёлых металлов, радионуклидов, продуктов нефтеперерабатывающей промышленности, хлор- и фосфорорганические соединения, что ведёт к увеличению их поступления и длительного воздействия на организмы животного мира, в том числе на пчёл.

Пчелиная семья чувствительна даже к незначительным изменениям окружающей среды, которые оказывают влияние как на пчелу, так и на микрофлору насекомых. Пчелы отличаются очень большим диапазоном интенсивности обмена веществ. В научной литературе до настоящего времени отсутствует целостная оценка микробиоты кишечного тракта медоносных пчел в условиях биогеохимических провинций антропогенного происхождения Тульской области [2].

Цель исследования – изучить особенности микробиоты кишечного тракта медоносных пчел (*Apis mellifera* L., 1758) в Тульской области.

Материалы и методы

Для того чтобы судить о радиоактивном загрязнении территорий региона и влиянии ионизирующей радиации на животных нами были отобраны пробы почвы и медоносных пчел.

Дозиметром «СИНТЕКС-ДБГ-01С» определялся радиационный фон местности. Для определения концентрации гамма-излучающих радионуклидов в почвах нами использовался гамма-спектрометр.

Микробиологические исследования проводились на базе ФГБНУ ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко. Микроорганизмы выделяли и идентифицировали с использованием классических бактериологических методик, используя наборы коммерческих селективных и диагностических питательных сред, и в целях дифференциации микробных культур проводили молекулярно-генетические исследования.

Для идентификации культур использовали тест-системы MICROBACT Staphylococcus 12S, MICROBACT 12E/A и 24E, STREPTOtest 16. Помимо тест-систем, производили также верификацию по морфологическим, биохимическим и культуральным признакам, согласно определителю Берджи [1].

Полученные количественные данные подвергались математической и статистической обработке.

Результаты и обсуждение

По площади радионуклидного загрязнения территория Тульской области занимает первое место среди других регионов России, пострадав-

ших от радиационной аварии [3]. Радиационный фон на изучаемых площадках Суворовского и Плавского районов составил $0,08 \pm 0,01$ и $0,15 \pm 0,05$ мкЗв/ч соответственно. Плотность поверхностного радиоактивного загрязнения Плавского района составила $18,1$ Ки/км², Суворовского – $0,34$ Ки/км². Таким образом, земли Плавского района подверглись действию радиоактивных осадков после аварии на ЧАЭС.

Доминирующими таксонами микробиоценоза пищеварительного тракта пчел Плавского района установлены *Staphylococcus* (100%), *Streptococcus* и *Escherichia coli* (50%). Добавочными таксонами определены *Klebsiella*, *Enterobacter* (40%), *Proteus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Candida* и *Fusarium* (30%). Нами установлено, что *Mucor* (20%) и *Citrobacter* (10%) относятся к категории случайных видов.

В Суворовском районе также доминировали *Staphylococcus* (100%), *Streptococcus* (70%), *Escherichia coli*, *Enterobacter* и *Enterococcus* (50%). У пчел в 30% случаях был также определен добавочный таксон – *Citrobacter*. К случайным видам были отнесены *Proteus*, *Hafnia* (20%), *Shigella*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Proteus*, *Micrococcus* и *Candida* (10%).

На основании полученных результатов и анализа литературных данных нами предложена гипотеза о том, что выделенные из пищеварительного тракта медоносных пчел доминирующие таксоны микроорганизмов являются симбионтами. Подавляющее большинство выделенных микроорганизмов обладают рядом ферментов, расщепляющих углеводы, а вторичные продукты обмена (молочная и пировиноградная кислоты) снижают развитие грибковых инфекций. Этим они облегчают суровую жизнь своих хозяев в зимний период.

Заключение

Таким образом, выделенная микрофлора пчел Тульского региона является симбионтной и активно участвует в метаболизме осенней генерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е изд. М.: Мир, 1997.
2. Сердюченко И.В., Терехов В.И., Овсянников Д.А. Количественная оценка микрофлоры пищеварительного тракта пчел // Труды КубГАУ. Серия: Ветеринарные науки. 2009. Вып. №1. Ч. 1. С. 96–98.
3. Щукин М.В., Сodbоев Ц.Ц., Пак В.В., Фролова В.С. Распределение и миграция радионуклидов в почвах Тульской области // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2014. № 8. С. 75–80.

Features of the microbiota of the intestinal tract of honey bees (*Apis mellifera*) in the Tula Region

Shchukin M.V., Sodboyev Ts.Ts., Fedorov D.A., Bulgakov A.V., Martynova A.V.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

The microbiocenoses of the intestinal tract of *Apis mellifera* in the biogeochemical province of anthropogenic origin in the Plavsky District, Tula Region, are represented by dominant *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* and additional taxa of *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Candida*, and *Fusarium*. It was established that the habitat of bees of the Suvorovsky District is in the clean zone and the most common taxa of the digestive system are *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, and the additional one is *Citrobacter*.

Key words: honeybees, microorganisms, radionuclides, radiation, Tula Region, microbiota, intestinal tract

***Brassica napus* – кормовая культура на загрязнённых радионуклидами почвах Тульской области**

Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Дельцов А.А., Тележенков А.П., Федоров Д.А., Булгаков А.В., Мартынова А.В.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

E-mail: vetbio2013@mail.ru

Аннотация

Наиболее серьёзным последствием чернобыльской аварии сейчас является ведение сельскохозяйственного производства в условиях радионуклидного загрязнения. В данной статье рассматривается накопление радионуклидов рапсом *Brassica napus*, культивируемым при радиоактивном загрязнении в Плавском районе Тульской области, с поверхностным радиоактивным загрязнением 18,1 Ки/км². Наибольшая доля общей удельной активности ¹³⁷Cs в девственных горизонтах почвы приходится на верхние 10-сантиметровые слои. Данные авторов позволяют оценить возможность использования *Brassica napus*, произрастающего в биогеохимических провинциях антропогенного происхождения региона, для производства кормов. Доказано влияние ионизирующего излучения на индукцию мутагенеза культуры.

Ключевые слова: рапс полевой, цезий-137, миграция, мониторинг, радионуклиды

Введение

В условиях развёртывания программы по импортозамещению в сельском хозяйстве Российской Федерации запланировано значительное увеличение поголовья продуктивных сельскохозяйственных животных, что влечёт за собой необходимость наращивания собственного высокотехнологичного и высокоэффективного кормопроизводства.

Сельскохозяйственные растения – основной источник поступления радионуклидов в организм животных. Следовательно, необходимо учитывать аккумуляции в кормовых культурах как отдельных радиону-

кливо́в, так и их суммарную удельную концентрацию, потому что некоторые растения способны накапливать в значительных количествах радиоактивные вещества, которые переходят в организм сельскохозяйственного скота и далее по пищевой цепочке к человеку, повышая риск возникновения у него генетических эффектов [1]. Этим обусловлена необходимость продолжения радиэкологических исследований в сфере сельскохозяйственного кормопроизводства и животноводства с учетом территориальных природно-климатических особенностей [2].

Накопление радиоксенобиотиков растениями зависит от их биологических особенностей, среди которых исследователи выделяют филогенез: растения, имеющие раннее эволюционное происхождение, набирают больше радиоактивных веществ, чем растения более поздних периодов [2]. Некоторые ученые склонны объяснять подобный феномен тем, что накопление в организме растений радиоактивных элементов защищает их от вредителей и инфекций.

Рапс полевой (*Brassica napus*) – однолетнее травянистое растение, известное в культуре ещё в IV тысячелетии до н. э., естественный гибрид, генетическими предками которого являются капуста полевая (*Brassica campestris*) и капуста огородная (*Brassica oleracea*). В настоящее время культура выращивается для производственной заготовки силоса, сенажа и комбикормов. Для коров молочного направления в период лактации основным резервом дополнительного протеина и незаменимых аминокислот в рационе является *Brassica napus* [1].

Целью исследования было изучить радионуклидный состав *Brassica napus*, культивируемого в Плавском районе Тульской области.

Материалы и методы

Основные климатические данные Плавского района (табл. 1) в целом схожи с показателями центральной части России, но не стоит исключать, что под влиянием ландшафта и состава материнских пород климатические характеристики района могут изменяться.

Таблица 1. Климатогеографическая характеристика Плавского района

Доминирующие типы почвы	Дерново-подзолистые
Климат	Умеренно-континентальный
Средняя температура зимой, С°	-10; -11
Средняя температура летом, С°	+19; +20
Влажность, мм/год	475–575

Радиационный фон на изучаемых площадках определяли дозиметром «СИНТЕКС-ДБГ-01С».

Пробы целинных почв и *Brassica napus* без видимых повреждений отбирали в соответствии с методическими указаниями [3, 4]. Образцы сельскохозяйственной культуры подвергали измельчению и сушке, после чего помещали в сосуд Маринелли и проводили измерения в свинцовой камере. Для определения концентрации радионуклидов использовался гамма-спектрометр с твердым сцинтилляционным детектором *NaI* и программным обеспечением «Прогресс». Полученные количественные данные подвергались математической и статистической обработке.

Результаты и обсуждение.

По площади радионуклидного загрязнения территория Тульской области занимает первое место среди других регионов России, пострадавших от радиационной аварии, поскольку радиоактивными осадками в 1986 году были загрязнены земли 18 из 25 районов Тульской области [3, 4].

Радиационный фон на изучаемых площадках Плавского района составил $0,15 \pm 0,04$ мкЗв/ч и не превышает нормальный радиационный фон, равный $0,20$ мкЗв/ч. Радиационный фон Плавского района снижается за счет физического распада ^{137}Cs ($T_{1/2} = 30$ лет) и его вертикальной миграции по почвенному профилю, которая отражена в таблице 2.

Таблица 2. Вертикальное распределение ^{137}Cs в почвенных срезах

Слой почвы, см	Удельная активность ^{137}Cs в почвах Плавского района, Бк/кг	% от общей активности
0–5	$921,2 \pm 91,9$	41,3
5–10	$796,4 \pm 97,7$	35,7
10–20	$513,3 \pm 37,1$	23,0

Львиная доля от общей удельной активности ^{137}Cs в целинных почвенных горизонтах Плавского района приходится на верхние 10-сантиметровые слои. Это связано с наличием большого количества органических веществ (гумус, гуминовые кислоты) в почвах изучаемых территорий, которые замедляют вертикальную миграцию ^{137}Cs в почвенном профиле. Установлено, что суммарная удельная активность ^{137}Cs на рассматриваемых площадках Плавского района составила $2230,9$ Бк/кг и соответствует плотности поверхностного радиоактивного загрязнения $18,1$ Ки/км².

Почва является наиболее важным звеном, и от скорости миграции радионуклидов в почвах во многом зависят темпы их распространения по

пищевой цепочке. Содержание естественных радионуклидов в почвах, как правило, наследуется от почвообразующих пород. Несмотря на возросший интерес к экологическим проблемам, в том числе связанным с увеличением концентраций химических элементов в окружающей среде под влиянием деятельности человека, нельзя забывать и о процессах вертикальной миграции и концентрации естественных радиоактивных элементов (табл. 3).

Таблица 3. Вертикальное распределение естественных радионуклидов в почвенных срезах

Слой почвы, см	Удельная активность естественных радионуклидов в почвах Плавского района, Бк/кг					
	^{40}K	%	^{232}Th	%	^{226}Ra	%
0–5	280,0 ± 29,2	31,0	39,6 ± 21,6	33,8	84,4 ± 38,8	37,1
5–10	293,0 ± 23,8	32,5	41,5 ± 20,4	35,5	75,4 ± 32,8	33,1
10–20	329,0 ± 13,0	36,5	35,9 ± 17,7	30,7	67,7 ± 28,1	29,8

В биосфере отношение ^{40}K к стабильному ^{39}K – неизменная величина, поэтому количество ^{40}K демонстрирует резерв ^{39}K в почвах и не является показателем радионуклидного загрязнения. Выявленные повышенные удельные активности ^{232}Th и ^{226}Ra в изучаемых почвах, превышающие кларковые значения, обусловлены рассеянными и рудными концентрациями урана в угленосных породах. В Тульской области урановые месторождения были обнаружены в середине прошлого столетия, и они встречаются практически во всех районах региона.

В ходе спектрометрического анализа мы не обнаружили в образцах почвы ^{134}Cs ($T_{1/2} = 2$ года); это указывает на то, что на территориях Тульской области отсутствуют радиоактивные выпадения после аварии на АЭС Фукусима (Япония, 2011 г.).

Таким образом, земли Плавского района подверглись действию радиоактивных осадков после аварии на ЧАЭС, и на этих территориях основным дозообразующим радиоактивным элементом остается ^{137}Cs .

Доподлинно известно, что искусственные радионуклиды содержатся в почвах в довольно низких концентрациях относительно биогенных элементов, которые в значительных количествах образуются в процессе разрушения почвообразующих материнских пород. Механизм поглощения радионуклидов корневыми волосками растений схож с усвоением биогенных элементов (*K*, *Mg*, *Ca* и др.) и происходит это посредством ионно-обменных реакций и диффузии.

На территориях Плавского района внесение минеральных удобрений приводит к увеличению площадей почв со значительным содержанием подвижных форм калия. Такие контрмеры – вполне оправданный шаг, ведь при высокой концентрации калия в почвенном растворе значительно снижается поступление ^{137}Cs , и происходит его дискриминация относительно калия. Диаметр ионов $^{137}\text{Cs}^+$ значительно превышает диаметр K^+ и затрудняет их диффузию через клеточную мембрану, приводя к блокировке калиевых каналов, разблокировка которых требует потери дополнительной энергии.

Как видно из данных, представленных в таблице 4, удельная активность ^{137}Cs в стеблях на 31,3% ниже, чем в фотосинтезирующих органах. В хозяйстве, несмотря на внесение калийных удобрений, наблюдается высокая концентрация ^{137}Cs в растении, и, вероятно, это связано как с поверхностным внесением K , так и снижением его подвижной формы в глубоких слоях почвы.

Таблица 4. Концентрация радионуклидов в *Brassica napus*, Бк/кг

Органы	^{137}Cs	^{40}K	^{232}Th	^{226}Ra
Листья	245,50 ± 57,37	751,01 ± 32,43	58,21 ± 9,52	220,25 ± 33,13
Стебли	168,75 ± 32,43	533,25 ± 16,21	57,40 ± 11,32	131,12 ± 34,66

После радиационной аварии в Плавском районе была проведена глубокая вспашка сельскохозяйственных угодий, вследствие которой искусственные радионуклиды были выведены за пределы традиционного пахотного горизонта (30–40 см). Мощные корни *Brassica napus* проникают в почву на 2–3 метра и на глубине около 40–45 см распространяются в горизонтальном направлении, где, по-видимому, корневая система растения активно поглощает загрязнения техногенной катастрофы и способствует продвижению ^{137}Cs и накоплению его в стебле и листьях.

В настоящее время нормативно-технические документации не регламентируют требования по содержанию радионуклидов в кормовых культурах, что затрудняет ведение контроля качества кормов на этапе их заготовки.

Заключение

Таким образом, радионуклидное загрязнение в Плавском районе Тульской области влияет на экологию сельскохозяйственной культуры и приводит к тератогенным эффектам *Brassica napus*. Полученные результаты подтверждают целесообразность организации экологического мониторинга миграции радионуклидов в цепочке «почва – растение».

ЛИТЕРАТУРА

1. Асташева Н.П., Ульяненко Л.Н., Голубев В.М. Использование нетрадиционных культур для реабилитации радиоактивно загрязненных территорий // Материалы международной науч.-практ. конф. «Чернобыль – 30 лет», посвящённой 30-летию со дня катастрофы на Чернобыльской АЭС. М.: Академия ГПС МЧС России, 2016. С. 9–11.
2. Удалова А.А., Гераськин С.А., Алексахин Р.М., Киселев С.М. Современные подходы к оценке радиационного воздействия на окружающую среду // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2013. № 4. С. 23–33.
3. Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Пак В.В., Фролова В.С. Распределение и миграция радионуклидов в почвах Тульской области // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2014. № 8. С. 75–80.
4. Щукин М.В., Содбоев Ц.Ц., Калеменин С.А., Бирюкова Н.В. Вертикальная миграция радионуклидов в почвах Плавского района Тульской области // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 5. С. 132–136.

***Brassica napus*, a fodder crop on radionuclide contaminated soils of the Tula Region**

Shchukin M.V., Sodboyev Ts.Ts., Deltsov A.A., Telezhenkov A.P., Fedorov D.A., Bulgakov A.V., Martynova A.V.

K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

The most serious consequence of the Chernobyl accident now is the conducting of agricultural production under radionuclide contamination. This article deals with the accumulation radionuclides by *Brassica napus* cultivated under radioactive contamination in the Plavsky District of the Tula Region, with a surface radioactive contamination being 18.1 Ku/km². The highest proportion of the total specific activity of ¹³⁷Cs in virgin soil horizons is on the upper 10-cm layers. The data of the authors make it possible to assess the possibility of using *Brassica napus*, which grows on the biogeochemical provinces of the anthropogenic origin of the region, for feed production. Evidence is given on the effect of ionizing radiation to induce mutagenesis of culture.

Key words: *Brassica napus*, cesium 137, migration, control, radionuclides

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Издательство «Сельскохозяйственные технологии»
Тираж 300 экз.
109472, Москва, ул. Ташкентская, д. 34, корп. 4
тел.: (495) 919-44-52, (495) 374-56-50
www.zoovetkniga.ru