



Kent Academic Repository

Kochish, Ivan I., Yildirim, Elena A., Laptev, Georgi Yu., Ilina, Larisa A., Tyurina, D G, Dubrovin, Andrei V., Filippova, Valentina A., Novikova, Natalia I., Tarlavin, N V and Romanov, Michael N. (2020) *[Guidelines for the use of a feed additive tested in an industrial environment on highly productive commercial laying hens]* *Методические рекомендации по использованию кормовой добавки, прошедшей испытания в промышленных условиях на высокопродуктивных промышленных курах-несушках. Technical report. Sel'skokhozyaistvennye tekhnologii / Сельскохозяйственные технологии, Moscow, Russia / Москва, Россия*
Downloaded from

<https://kar.kent.ac.uk/89170/> The University of Kent's Academic Repository KAR

The version of record is available from

This document version

Author's Accepted Manuscript

DOI for this version

Licence for this version

UNSPECIFIED

Additional information

In Russian

Versions of research works

Versions of Record

If this version is the version of record, it is the same as the published version available on the publisher's web site. Cite as the published version.

Author Accepted Manuscripts

If this document is identified as the Author Accepted Manuscript it is the version after peer review but before type setting, copy editing or publisher branding. Cite as Surname, Initial. (Year) 'Title of article'. To be published in **Title of Journal**, Volume and issue numbers [peer-reviewed accepted version]. Available at: DOI or URL (Accessed: date).

Enquiries

If you have questions about this document contact ResearchSupport@kent.ac.uk. Please include the URL of the record in KAR. If you believe that your, or a third party's rights have been compromised through this document please see our [Take Down policy](https://www.kent.ac.uk/guides/kar-the-kent-academic-repository#policies) (available from <https://www.kent.ac.uk/guides/kar-the-kent-academic-repository#policies>).

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Московская государственная
академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА
имени К. И. Скрябина»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО
ИСПОЛЬЗОВАНИЮ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ,
ПРОШЕДШЕЙ ИСПЫТАНИЯ В ПРОМЫШЛЕННЫХ
УСЛОВИЯХ НА ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ
ПРОМЫШЛЕННЫХ КУРАХ-НЕСУШКАХ**

Москва 2020

УДК 636.5: 636.082

Методические рекомендации по использованию кормовой добавки, прошедшей испытания в промышленных условиях на высокопродуктивных промышленных курах-несушках. – М.: Издательство «Сельскохозяйственные технологии», 2020. – ?? с.

Рекомендации подготовили: Кочиш И.И., акад. РАН, д. с.-х. н., профессор ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Ыылдырым Е.А., д. б. н.; Лаптев Г.Ю., д. б. н.; Ильина Л.А., к. б. н.; Тюрина Д.Г., к. б. н.; Дубровин А.В.; Филиппова В.А.; Новикова Н.И., к. б. н.; Тарлавин Н.В., специалисты ООО «БИОТРОФ+»; Романов М.Н., к. б. н., ведущий ученый мегагранта ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, исследователь Университета Кента (Великобритания).

Рецензент: Коломиец С.Н., д.б.н. профессор, зав. кафедрой кормления и кормопроизводства ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина.

Методические рекомендации разработаны в рамках Договора о выделении гранта № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г. в рамках реализации постановления Правительства Российской Федерации от 9 апреля 2010 г. № 220 по теме «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве». Методические рекомендации предназначены для специалистов и руководителей птицеводческих хозяйств, фермеров, научных работников, преподавателей, аспирантов и студентов сельскохозяйственных вузов, слушателей системы повышения квалификации.

Методические рекомендации одобрены УМК ФЗТА, Протокол № ?? от «??» ?? 2020 г.

ISBN

© ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Глава 1. Микробиом кур-несушек в норме и при дисбиозе	9
Глава 2. Причины дисбиоза кишечной микробиоты промышленной птицы	13
Глава 3. Результаты изучения эффективности кормовой добавки Профорт® для улучшения долголетия и продуктивности сельскохозяйственной птицы	22
3.1. Результаты лабораторных испытаний	34
3.2. Результаты полногеномного секвенирования	43
3.3. Результаты хроматографических исследований	49
3.4. Выживаемость пробиотических бактерий в пищеварительной системе	
3.5. Результаты испытаний кормовой добавки Профорт® в производственных условиях	
Заключение: Рекомендации по использованию кормовой добавки	58
Список литературы	61

ВВЕДЕНИЕ

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. Например, исследования, проведенные в США, продемонстрировали, что резистентность к гентамицину у изолятов *Campylobacter coli*, выделенных из куриного мяса, увеличилась с 1% в 2007 году до 18% в 2011 году. У бактерий *Salmonella* spp. было отмечено стремительное развитие множественной лекарственной устойчивости к антибиотикам, таким как тетрациклины, сульфаниламиды, стрептомицин, канамицин, хлорамфеникол и некоторые β -лактамы антибиотики.

По этой причине многие развитые страны давно начали борьбу с использованием антибиотиков при выращивании животных и птиц. В последние годы в нашей стране в практике птицеводства антибиотики широко использовались для массовой профилактики заболеваний и стимуляции роста птиц, однако в 2019 г. произошли резкие изменения, инициированные государством. Правительство России своим распоряжением № 604-р от 30.03.2019 г. в рамках реализации государственной Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации до 2030 г. устанавливает запрет на использование противомикробных препаратов для ветеринарного применения не в лечебных целях с 2020 г. Кроме того, с 2020 г. стартует регулирование использования противомикробных препаратов при изготовлении кормов и вступают в силу соответствующие изменения в законе «О ветеринарии».

Очевидно, что кормовые антибиотики не могут являться единственным средством модификации структуры микрофлоры. Большой интерес представляет использование натуральных биопрепаратов на основе пробиотических штаммов микроорганизмов.

В условиях интенсификации производства организм промышленных птиц поставлен в очень жесткие условия: состав рациона нацелен на сверхпродуктивность, корма поражены патогенами и их токсинами, большое поголовье концентрируется на ограниченных площадях, иммунитет ослаблен вирусами и вакцинациями. Применение пробиотиков на птице экономически оправдано, поскольку эта мера является существенным резервом значительного увеличения производства мяса и роста рентабельности производства.

В тоже время генетические детерминанты штаммов бактерий *Bacillus* spp., определяющие возможность биосинтеза разнообразных антимикробных соединений, представляют особый научный интерес, поскольку благодаря им эти микроорганизмы нашли широкое применение в качестве пробиотиков в промышленном птицеводстве. По мнению некоторых исследователей (Hong et al., 2010), штаммы рода *Bacillus* более перспективны для создания пробиотических препаратов, нежели традиционно используемые молочнокислые бактерии, поскольку образуют в цикле развития эндоспору и, следовательно, более устойчивы к агрессивным факторам пищеварительной системы. *Bacillus* spp. – типичные комменсальные бактерии кишечника сельскохозяйственных животных.

Антимикробные бактериальные метаболиты *Bacillus* spp. в среднем включают 87% органических кислот, спиртов, кетонов, алканов, альдегидов, алкенов от суммарной доли общего пула антимикробных компонентов и 13% других веществ – рибосомных пептидов (бактериоцинов и ферментов), поликетидов, нерибосомных пептидов (Caulier et al., 2019). На примере одного из штаммов *B. subtilis* показано, что по меньшей мере 4–5% его генома

приходится на долю оперонов, связанных с синтезом антимикробных соединений (Stein, 2005).

Интерес к вопросу синтеза бактериоцинов, а также пептидных и липопептидных антибиотиков штаммами *Bacillus* spp. в настоящее время возрос, появляются сведения о неизвестных ранее веществах (Begley et al., 2009). Многие из бактериоцинов *Bacillus* spp. относят к лантибиотикам категории посттрансляционно модифицированных пептидов, широко распространенных среди различных бактериальных таксонов.

Представители рода *Bacillus* также продуцируют множество немодифицированных бактериоцинов, некоторые из которых сходны с педиоциноподобными бактериоцинами молочнокислых бактерий, в то время как другие имеют совершенно новые пептидные последовательности. Бактериоцины *Bacillus* spp. представляют большой практический интерес в связи с возможностью ингибировать разнообразные патогенные формы, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии, дрожжи и микромицеты.

Ряд работ посвящен изучению синтеза микроорганизмами рода *Bacillus* органических кислот с антимикробной активностью в отношении кишечных патогенов. Есть указания на возможность продуцирования некоторыми представителями *Bacillus* spp. молочной кислоты (Poudel et al., 2015), известной своей антимикробной активностью в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и др. (Alakomi et al., 2000). Штамм *Bacillus megaterium* ELI 24, выделенный из почвы в Мексике, секретировал значительные количества янтарной кислоты, которая была идентифицирована спектроскопическими методами (Ortiz et al., 2020). С использованием методов хроматографии было показано, что штамм *Bacillus megaterium* P1, изолированный из почвы, в зависимости от состава среды для культивирования синтезировал летучие (муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную) и нелетучие органические кислоты (щавелевую кислоту, яблочную кислоту, янтарную кислоту, винную кислоту и лимонную кислоту) в различных комбинациях (Chuanqing et al., 2017).

ГЛАВА 1. МИКРОБИОМ КУР-НЕСУШЕК В НОРМЕ И ПРИ ДИСБИОЗЕ

В пищеварительной системе птиц присутствует множество разнообразных микроорганизмов. Учёными установлено, что в здоровом организме микробиота представляет сложную и сбалансированную симбиотическую микроэкосистему с нормальными метаболическими свойствами. Основной функцией нормобиоты является выработка ферментов (целлюлаз, протеаз и др.), необходимых для пищеварения, участия в обмене веществ, защиты организма от патогенов и токсинов, синтеза летучих жирных кислот и витаминов, формирования иммунитета и др.

Однако, кроме нормофлоры, в кишечнике птиц присутствуют микроорганизмы, представляющие угрозу здоровью, их называют условно-патогенными (энтеробактерии, актиномицеты и др.) и патогенными (сальмонеллы, пастереллы и др.). Пока микрофлора кишечника и иммунитет в норме, то проблем с этими группами не возникает, их содержание находится на низком уровне, однако в случае снижения резистентности происходят нарушения микроэкологии кишечника – **дисбиозы**. Увеличение количества условно-патогенных форм вызывает метаболические и иммунные расстройства организма, что отражается на мясной и яичной продуктивности и сроке хозяйственного использования.

Для полноценной диагностики и определения причин нарушений используется лабораторное исследование состава кишечной микробиоты.

В результате такого анализа все присутствующие микроорганизмы разбиваются по родам и видам и устанавливаются их функции. Это является важнейшим шагом в диагностике заболевания, причин снижения продуктивности и срока хозяйственного использования, выбора правильной терапии и методов профилактики.

В желудочно-кишечном тракте птиц обитает около 600–900 видов бактерий. Выполняя анализ бактерий при помощи культуральных методов мы можем узнать о присутствии около 20–30 видов бактерий, которые мы выбрали только потому, что они в состоянии расти в этой питательной среде. Большая часть кишечных обитателей не культивируется, то есть увидеть своими глазами их колонии в чашке Петри мы не можем. Иными словами, делая выводы о состоянии микробиоты по 20–30 видам, мы игнорируем подавляющее большинство бактерий.

Поэтому на современном этапе развития науки для анализа микробного «мегаполиса» кишечника используются методы метагеномики, позволяющие за 1 «прогон» описать все 100% бактерий микробной экосистемы. Когда такие технологии появились, выяснилось, что от 50 до 99% видов, обнаруживаемых при генетическом анализе вообще не известны науке.

Одна из наиболее сложных, современных и дорогостоящих технологий, используемых для анализа метагенома, – это NGS-секвенирование (next generation sequencing), которое позволяет выявить полный видовой состав всех микроорганизмов.

Здоровье и продуктивность птиц зависит от разнообразия видового состава микрофлоры. Чем больше видов бактерий, тем выше компенсаторный потенциал всей микробиоты – при исчезновении одного или нескольких видов полезных бактерий, их могут начать вытеснять патогенные формы.

Как оказалось, для каждого из патологических состояний организма (будь то заболевания или падение продуктивности) свойственно особенное количественное и качественное содержание микроорганизмов в кишечнике, поэтому определены пороговые значения для тех или иных групп микроорганизмов.

На основании того в каком соотношении и какие именно группы микроорганизмов содержатся в кишечнике, можно заключить о балансе полезных и патогенных бактерий и сделать выводы о причинах снижения продуктивности и срока хозяйственного использования.

Для кишечного микробиома, как и для других микроорганизмов, характерна выраженная гетерогенность свойств внутри рода в связи с высокой изменчивостью геномов бактерий. Разные виды бактерий внутри общей таксономической группы обладают совершенно разными свойствами. Поэтому, описывая состав микробиома пищеварительной системы, бактерии необходимо разделять не только по физиологическим группам, семействам, родам, но и по видам. Например, внутри рода *Clostridium* встречаются как патогенные формы, так и виды, связываемые с высокой продуктивностью, в частности, *C. butyricum* – известный продуцент масляной кислоты. Масляная кислота или бутират является основным энергетическим материалом для клеток слизистой оболочки кишечника, а также проявляет противовоспалительные свойства.

По значению доли представителей нормофлоры целлюлозолитиков можно оценить способность микробиоты птиц расщеплять некрахмалистые полисахариды кормов, а значит, понять эффективность работы пищеварительной системы. В здоровом кишечнике суммарно эти бактерии должны доминировать, падение их содержания говорит о нарушении процессов переваривания кормов. Доля бактерий рода *Bacillus* указывает на уровень способности синтезировать антимикробные вещества, а, следовательно, уровень защищенности организма от заболеваний. Кроме того, с успехом можно оценить потенциал микробиоты к синтезу витаминов, короткоцепочечных жирных кислот, в том числе, высокоценного бутирата.

Витаминообразующий потенциал микроорганизмов – тоже важный показатель, поскольку не все витамины могут образовываться в организме животных и птиц, некоторая их доля синтезируется микроорганизмами, обитающими в кишечнике.

На основании исследования микробиоты кишечника кур-несушек нами были выделены характерные для различных заболеваний профили видового состава патогенных бактерий. Получая картину присутствия патогенных форм, можно спрогнозировать риск развития заболеваний и проблем с продуктивностью (рис. 1).

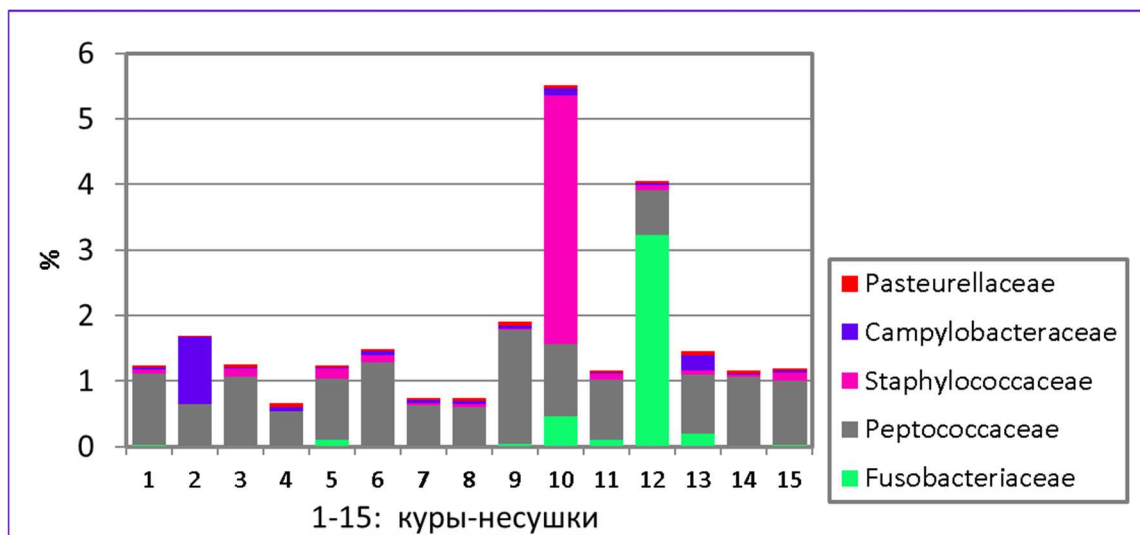


Рис. 1. Содержание патогенов в кишечнике кур-несушек:

1–9, 11, 13–15 – здоровые несушки без дисбиотических нарушений,
10, 12 – несушки с риском гастроэнтеритов, инфекций сухожильно-связочного аппарата и суставов, воспалительных заболеваний

В условиях интенсификации производства организм птиц поставлен в очень жесткие условия: состав рациона нацелен на сверхпродуктивность, корма поражены патогенами и их токсинами, большое поголовье концентрируется на ограниченных площадях. Это ведет к нарушению хрупкого баланса между кишечными микроорганизмами, заболеваемости, снижению продуктивности, массовому падежу, снижению уровня безопасности продукции.

Присутствие патогенов в кормах – одна из наиболее распространенных причин дисбаланса микрофлоры ЖКТ птиц. Так, при изучении микрофлоры комбикормов методом NGS-секвенирования в лаборатории ООО «БИОТРОФ» удалось установить, что гастроэнтериты у кур на одной из птицефабрик были связаны с присутствием в корме возбудителей опасных заболеваний пастерелл (4,64%), фузобактерий, стафилококков (рис. 2А), на другой птицефабрике в корме были выявлены патогенные энтеробактерии (6,08%) и кампилобактерии (рис. 2Б). Возможно, внутриклеточная локализация бактерий в растительных кормах, а также возможность формирования биопленок защищает их от воздействия высоких температур при экспандировании и экструдировании.

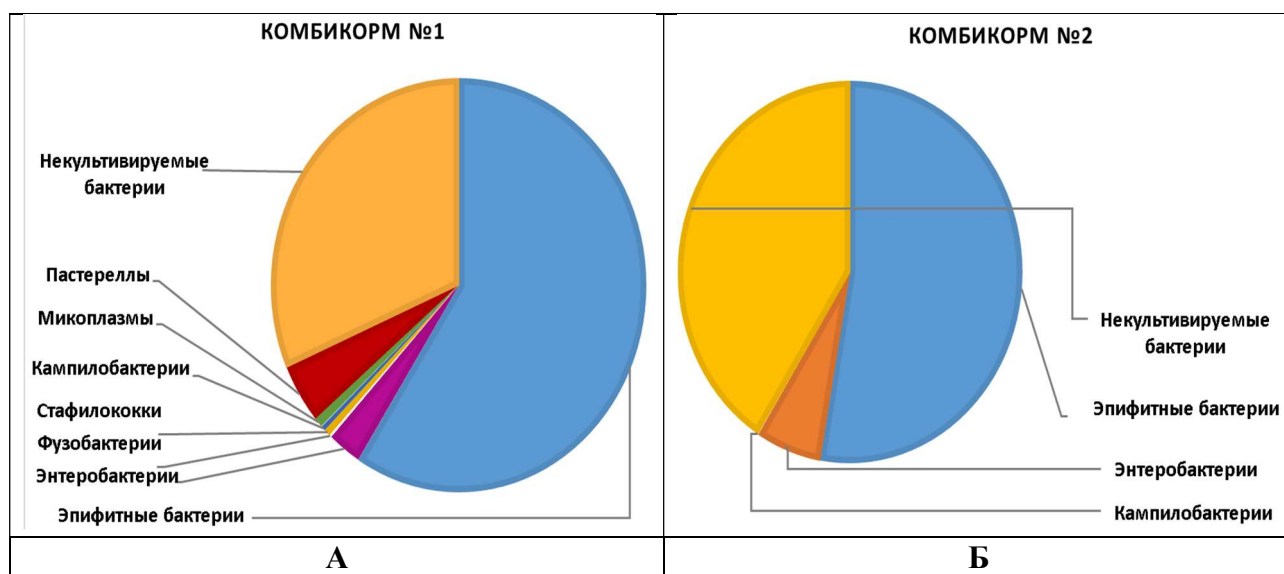


Рис. 2. Содержание микрофлоры в комбикормах: А – № 1 и Б – № 2 (№ 1 и № 2 – условные номера птицефабрик)

Таким образом, корма могут являться фактором передачи возбудителей инфекционных заболеваний, что может отрицательно сказываться на продуктивности и сроке хозяйственного использования птиц.

ГЛАВА 2. ПРИЧИНЫ ДИСБИОЗА КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПТИЦЫ

Как и любая сложная система, организм животных и птиц подвержен влиянию множества факторов, как внешних, так и внутренних, многие из которых могут негативно влиять на микрофлору, провоцировать нарушения здоровья и падение продуктивности.

Интересно, что в последние годы качество питьевой воды, как источника заражения патогенами, привлекает много внимания специалистов и консультантов, причем это касается не только животных и птиц, но и человека. Тем не менее, образцы воды, отобранные специалистами НПК «БИОТРОФ» на птицефабриках, а также смывы с поилок, оказались низко обсемененными бактериальной флорой (не более 10^3 КОЕ/мл).

Основным же резервуарами возбудителей инфекций оказались корма, присутствие патогенов в которых является одной из наиболее распространенных причин дисбаланса микрофлоры желудочно-кишечного тракта птиц.

Обобщая результаты 14 анализов, проведенных на нескольких ведущих птицефабрик страны, оказалось, что среди патогенных и потенциально патогенных бактерий, взаимодействующих с кормами, встречались сальмонеллы, иерсинии, *Enterococcus cecorum* и ряд других опасных возбудителей заболеваний (табл. 1). Большинство кормов было контаминировано одновременно несколькими патогенами. Например, *Escherichia spp.* и *Staphylococcus spp.* встречались во всех исследованных пробах.

Таблица 1

Результаты мониторинга содержания патогенов в кормах птиц методом NGS-секвенирования

Патоген	Заболевание	Содержание среднее- максимальное, клеток/г корма	Встречаемость в пробах, %
<i>Enterococcus cecorum</i>	Заболевания опорно-двигательного аппарата, энтериты	$1,8 \times 10^4 - 3,4 \times 10^4$	23
<i>Klebsiella</i> spp.	Клебсиеллез с разнообразной симптоматикой, трансвариальное заражение эмбрионов с последующим замиранием развития	$1,4 \times 10^4 - 3,3 \times 10^4$	31
Pasteurellaceae	Пастереллез (геморрагическая септицемия)	$3,5 \times 10^4 - 4,4 \times 10^4$	62
<i>Yersinia</i> spp.	Кишечный иерсиниоз	$6,4 \times 10^4 - 1,9 \times 10^5$	85
<i>Legionella</i> spp.	Болезни органов дыхания	$6,2 \times 10^3 - 4,5 \times 10^4$	46
<i>Escherichia</i> spp.	Гастроэнтериты	$3,4 \times 10^5 - 7,7 \times 10^5$	100
<i>Staphylococcus</i> spp.	Инфекции трубчатых костей, сухожильно-связочного аппарата и суставов	$2,8 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$	100
<i>Streptococcus</i> spp.	Септицемии	$7,9 \times 10^4 - 1,3 \times 10^5$	77
<i>Campylobacter</i> spp.	Кампилобактериоз – острая кишечная инфекция, опасная в большей степени для человека	$2,3 \times 10^3 - 1,9 \times 10^4$	15
<i>Salmonella enterica</i>	Сальмонеллез (чаще в виде септицемии и диареи)	$3,4 \times 10^4 - 6,1 \times 10^4$	31
<i>Mycoplasma</i> spp.	Микоплазмоз – поражение органов дыхания	$1,9 \times 10^4 - 9,4 \times 10^4$	62
<i>Erysipelothrix</i> spp.	Рожистое воспаление у людей	$5,3 \times 10^2 - 5,8 \times 10^3$	8

При этом внешний вид пораженного патогенами комбикорма не отличался от условно «чистого» комбикорма.

Возникает вопрос, каким же образом все эти патогены проникли в корма? Дело в том, что корма для птиц имеют преимущественно растительное происхождение, а ведь растения – это естественная среда обитания не только эпифитных и эндофитных микроорганизмов, но нередко и возбудителей так называемых сапронозных инфекций, для которых главным естественным местом обитания являются абиотические (неживые) объекты окружающей среды.

О присутствии патогенов в кормах для животных птиц известно уже давно. Еще в 1986 году Г.В. Ющенко (Ющенко, 1986) установила значительную роль грызунов в инфицировании возбудителем иерсиниоза объектов агрокомплекса, включая корма и подстилку. Тем не менее список возбудителей заболеваний постоянно пополняется представителями некультивируемых микроорганизмов, о существовании которых стало известно только в связи с развитием молекулярно-биологических методов изучения микрофлоры.

Почему же температурная обработка при гранулировании не является надежным средством против патогенов?

Причины сохранности патогенов при нагревании, по нашему мнению, заключаются в их особой эволюционно сформированной стратегии выживания. Во-первых, многие из них имеют меж- и внутриклеточную локализацию в растительных ингредиентах кормов. Быстрая адаптация к агрессивным условиям окружающей среды позволяют в нужный момент переходить в покоящееся (некультивируемое) состояние (Литвин и др., 1998). Большинство патогенов обладают способностью формировать биопленки благодаря «оснащенности» жгутиками, пилями и возможностью синтезировать особые защитные вещества – экзополисахариды. Не исключено, что воздействие агрессивных факторов (температуры и низкой влажности) может создать эффект стимуляции запуска механизмов выживаемости, которые в дальнейшем приводят к резкому увеличению концентрации патогенов при попадании в организм.

Возбудителей заболеваний, присутствующих в кормах, не следует недооценивать. Ведь многие из них характеризуются полигостальностью – широким кругом потенциальных хозяев, они могут стать общими как для птиц, так и для потребителя продукции птицеводства – человека.

В связи с этим, информация о микрофлоре помещений, подстилки, кормов также является важным ресурсом производительности.

Именно из-за высокой обсемененности кормов патогенные формы будут всегда присутствовать в здоровом организме, вызывая инфицирование при снижении резистентности. На рисунке 3 представлены данные встречаемости патогенов в содержимом кишечника клинически здоровых промышленных бройлеров и несушек методом NGS-секвенирования. Сведения были получены на основе многолетних мониторинговых исследований на ведущих яичных и бройлерных птицефабриках. Для сравнения приведены результаты представленности патогенных форм в кормах, которые наглядно подтверждают их циркуляцию по звеньям технологической цепи.

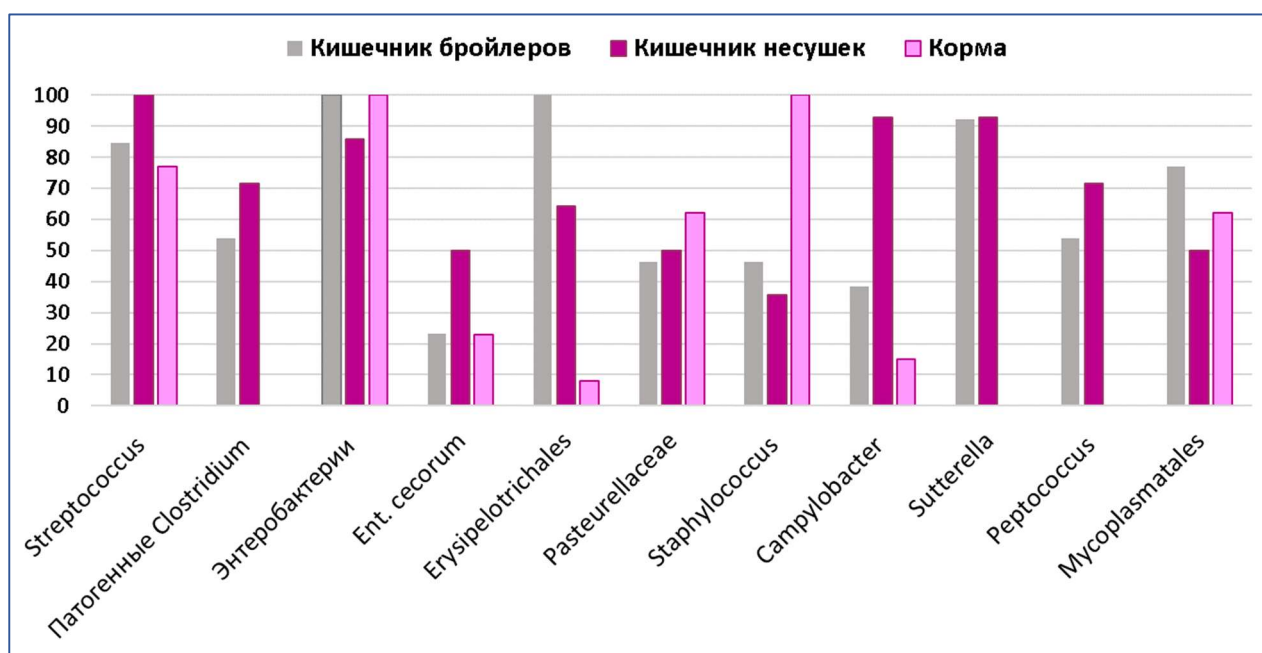


Рис. 3. Частота встречаемости патогенов в кишечнике клинически здоровых кур и кормах, %

Интересно, что у птиц с симптомами гастроэнтеритов, в кишечнике которых выявляли увеличение численности ассоциаций патогенных форм, на ткани суставов также обнаруживали ряд условно-патогенных и патогенных бактерий – энтеробактерий, клостридий (среди которых встречался *Clostridium perfringens* – возбудитель некротического энтерита кур), пептострептококков и дрожжей *Candida* spp. (рис. 4).

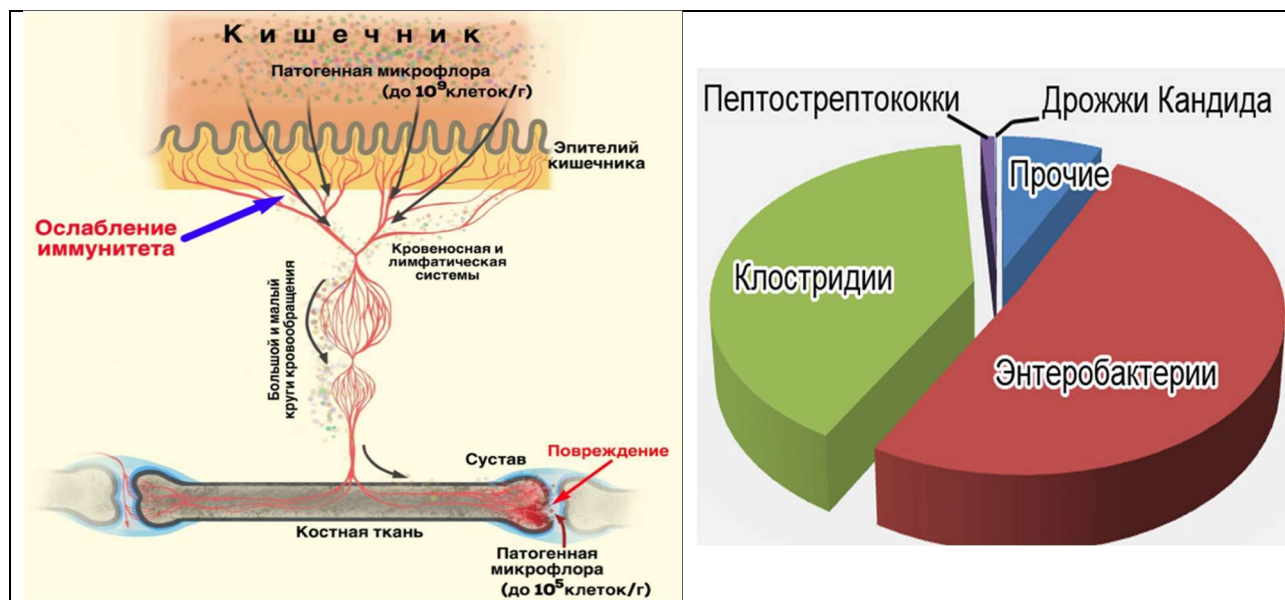


Рис. 4. Распространение кишечных патогенов по организму кур

Как видно из рисунка 5, патогенные стафилококки обладают способностью к размножению, накоплению и циркуляции на птицефабрике по цепочке «корма – кишечник – подстилка». Аналогичную картину мы наблюдали также и для других возбудителей заболеваний птиц. Дело в том, что экологические особенности многих патогенов заключаются в способности к существованию вне связи с организмом животных и птиц, что позволяет микроорганизмам длительно сохраняться и размножаться во внешней среде, хорошо адаптируясь к ряду абиотических факторов (широкому диапазону температур, pH, влажности и др.), а также противостоять фагоцитозу простейшими – амебами, инфузориями и утилизации другими беспозвоночными. При попадании в благоприятные для роста и размножения условия кишечника по звеньям технологической цепи, патогенные бактерии увеличивают там свою численность (рис. 5).

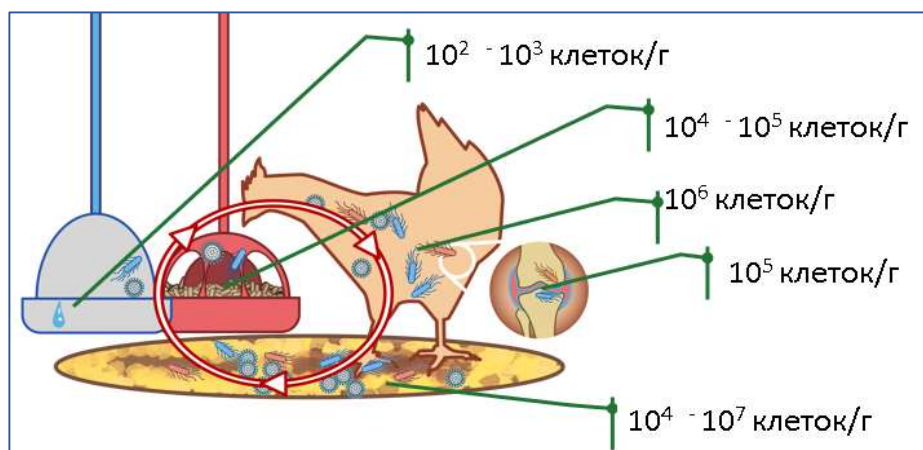


Рис. 5. Циркуляция стафилококков на птицефабрике

Одной из проблем, влекущих нарушения микробиома кур и возникновение других патологий, является присутствие в кормах микотоксинов. С появлением молекулярно-биологических методов исследования микрофлоры доказано, что микотоксины, поступающие с кормами, подавляют полезных представителей кишечного биоценоза: целлюлозолитиков, расщепляющих клетчатку кормов и бактерий, синтезирующих летучие жирные кислоты. Это приводит к доминированию в кишечнике патогенных форм. Установлено, что микотоксины превышают норму в большинстве кормовых ингредиентов для птиц. Как правило, в комбикормах выявляются несколько микотоксинов, что создает эффект синергизма.

На одной из лидирующих птицефабрик у птиц был диагностирован микотоксикоз, которому сопутствовали дисбиотические расстройства микрофлоры кишечника. Мы провели исследование содержания микотоксинов в различных видах и партиях кормов. Во всех исследованных видах кормов: кукурузе, шроте, различных партиях пшеницы и ячменя (рис. 6), – было выявлено превышение уровня ПДК по одному или нескольким микотоксинам. Особенно опасной оказалась пшеница: уровень ПДК по зеараленону и ДОН был превышен до 36,2 и 21,5 раз соответственно. Зеараленон и ДОН – это микотоксины, производимые грибом *Fusarium* еще в процессе вегетации в поле.

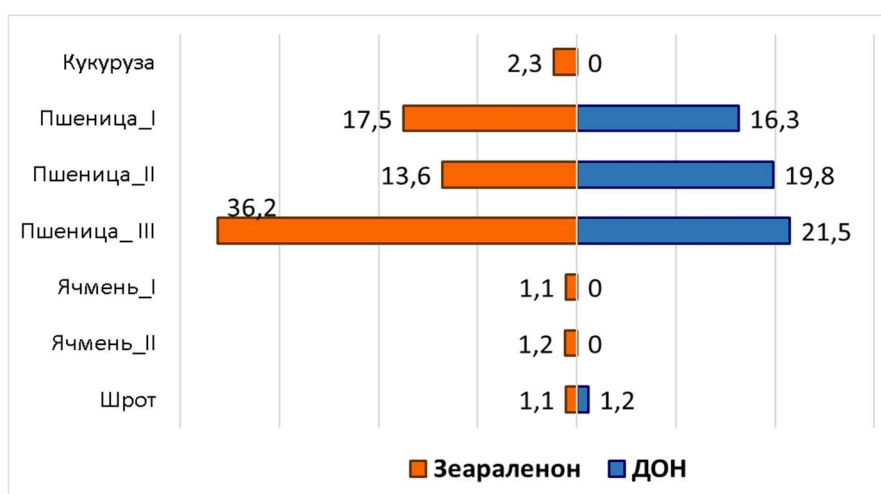


Рис. 6. Уровень превышения ПДК зеараленона и ДОН в кормах для птиц (I, II, III – различные партии кормов)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ПРОФОРТ® ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ДОЛГОЛЕТИЯ И ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Безопасные антибиотики естественного происхождения – бактериоцины, а также органические кислоты и другие вещества с антимикробными свойствами могут поступать в организм животных и птицы с рационом, в который введены специально отобраны штаммы-продуценты. Роль пробиотических добавок, которые разрабатывает НПК «БИОТРОФ», заключается в механизмах восстановления естественной резистентности нормобиоты. На «первом рубеже» пробиотики конкурируют с патогенами за рецепторы слизистой оболочки кишечника, другим этапом их работы является синтез антимикробных

веществ: карбоновых кислот и бактериоцинов. Яркий пример – многокомпонентный пробиотик Профорт[®], созданный на основе двух штаммов микроорганизмов *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium*.

3.1. Результаты лабораторных испытаний

Культуральными методами изучен спектр антимикробного влияния штаммов бактерий в составе Профорта[®] в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов – *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*, *Clostridium* spp., *Escherichia coli*.

Обнаружена ярко выраженная антимикробная активность. Так, например, установлено, что штамм бактерии *B. megaterium* обладал выраженным антагонистическим действием в отношении тест-культур *Staphylococcus aureus* и *Candida tropicalis* (табл. 2, рис. 7А, Б). Это позволяет предположить присутствие в составе культуральной жидкости *B. megaterium* диффундирующих в агар антимикробных веществ. *Clostridium* spp. являлся наиболее устойчивым к воздействию *B. megaterium* среди исследованных тест-объектов (зона задержки – $2 \pm 0,15$ мм).

Таблица 2

Размер зон задержки роста тест-штаммов под воздействием штамма *B. megaterium*, мм
($M \pm m$, n=3)

Тест-объекты	Диаметр зоны задержки роста, мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	$25 \pm 1,4$
<i>Candida tropicalis</i>	$10 \pm 0,7$
<i>Clostridium</i> spp.	$2 \pm 0,15$
<i>Escherichia coli</i>	$5 \pm 0,3$

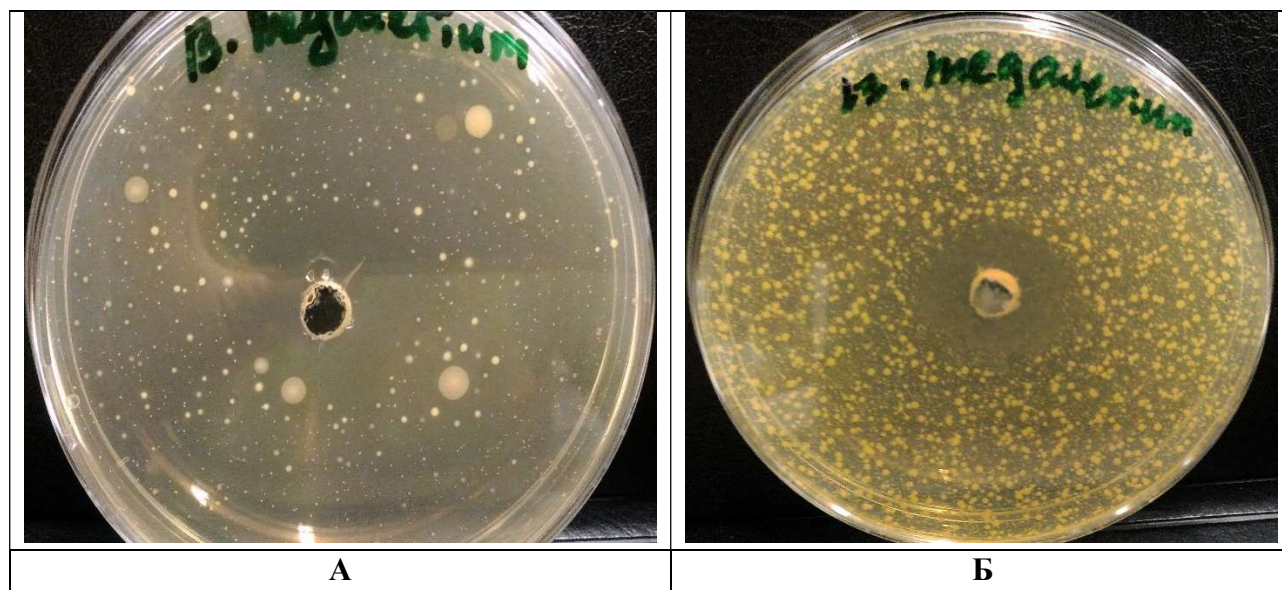


Рис. 7. Опыт по оценке антагонистического действия *B. megaterium* в отношении тест-культур: А – *Staphylococcus aureus* и Б – *Candida tropicalis*

Полученные данные имеют большое практическое значение, поскольку *Staphylococcus aureus* связан с возникновением заболеваний сельскохозяйственной птицы. В связи с этим Профорт® перспективен для подавления патогенной микробиоты, в частности, при интродукции в пищеварительную систему сельскохозяйственных птиц.

На рисунке 8 представлены результаты опыта, проведенного в условиях *in vitro*, по установлению уровня истинной биодеструкции микотоксинов штаммами бактерий *Bacillus* spp., который определяли как разницу между биодеструкцией живыми бактериальными клетками и сорбцией инактивированными клетками. Видно, что штамм бактерий в составе пробиотика Профорт® эффективно разрушает молекулы токсинов по сравнению с другими исследованными штаммами (под условными номерами 1, 2) того же вида.

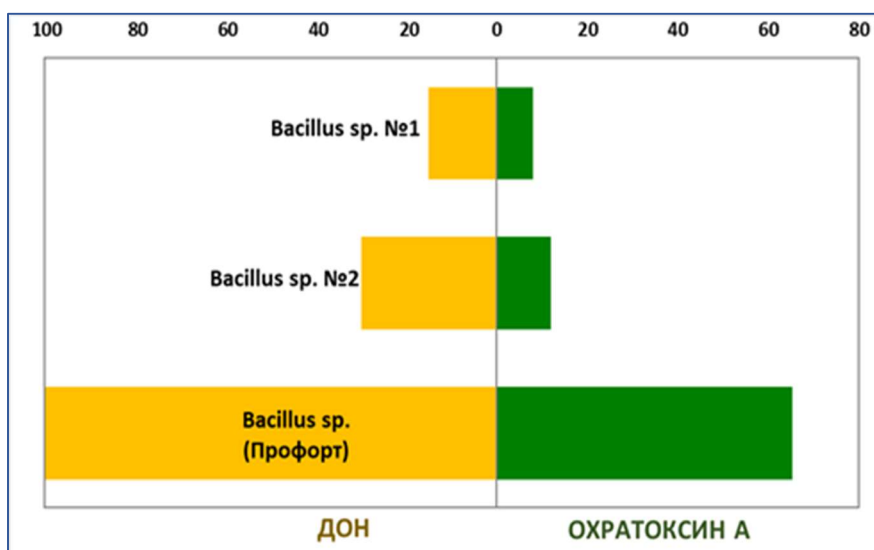


Рис. 8. Уровень биодеструкции микотоксинов *in vitro* штаммами *Bacillus* spp., %

3.2. Результаты полногеномного секвенирования

Для детального изучения всех свойств штаммов бактерий в составе Профорта® был применен инновационный метод полногеномного секвенирования, который позволил оценить функцию каждого гена в составе генома и описать все механизмы действия и биологический потенциал на молекулярном уровне.

Полногеномное секвенирование в настоящий момент признано наиболее эффективной технологией подробной генетической характеристики штаммов микроорганизмов, их свойств и метаболических процессов. Важным этапом системного анализа механизмов пробиотического действия, в частности антимикробной активности микроорганизмов, может быть реконструкция его метаболической карты, то есть сбор и визуализация всех потенциально возможных процессов клетки. Экспериментальные данные о степени антимикробной активности в отношении патогенных форм в совокупности с данными полногеномного секвенирования позволяют реконструировать максимально приближенные к реальности модели. Их построение дает возможность прогнозировать взаимоотношения микроорганизма с различными патогенными и условно-патогенными формами в условиях пищеварительной системы птиц с целью создания эффективных пробиотических биопрепаратов.

В настоящее время достаточно активно ведется работа по изучению геномов штаммов *Bacillus* spp., перспективных для создания биопрепаратов. Li с соавт. (Li et al., 2018) применяли метод полногеномного секвенирования для оценки пробиотического потенциала штамма *Bacillus* spp. DU-106, активного продуцента L-молочной кислоты. Другие исследователи (Khatri et al., 2019) применяли эту методику для исследования генома *Bacillus clausii* ENTPro, основы пробиотика Enterogermina. Секвенированием полных геномов штаммов *B. megaterium* занимались Eppinger с соавт. (Eppinger et al., 2011) проанализировавшие штаммы QM B1551 и DSM319. Vilchez в составе группы исследователей (Vilchez et al., 2018) изучил последовательность штамма TG1-E1, перспективного для создания земледобрильных препаратов. Liu с соавт. (Liu et al., 2011) исследовали геном штамма WSH-002, перспективного для создания рекомбинантных белков и витаминов.

Геном *B. megaterium* был аннотирован нами с помощью набора инструментов RAST с присвоением уникального геномного идентификатора 1404.252. Геном штамма *B. megaterium* представлен одной кольцевой хромосомой размером 6 113 972 п. н. пар нуклеотидов, содержащей 37,5% Г/Ц-пар. В состав хромосомы входит 6324 открытых рамок считывания, способных определять синтез полипептидов, 129 – синтез тРНК и 6 – рРНК. Плазмидная часть включает 78379 п. н. и содержит 23,5% Г/Ц-пар, что на 14% меньше, чем в хромосоме.

Сравнение контигов исследуемого штамма с базой данных нуклеотидных последовательностей PATRIC показало высокую степень сходства анализируемого штамма с геномом *B. megaterium* QM B1551 545693.3 (рис. 9). Оба этих штамма аналогичны двум другим штаммам *B. megaterium*.

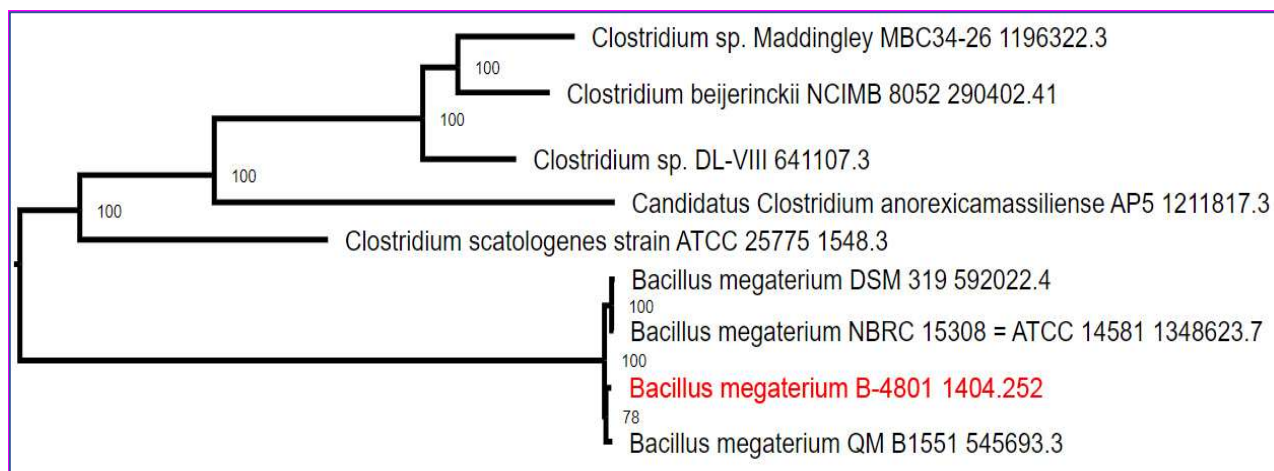


Рис. 9. Дендрограмма, отражающая филогенетическое родство исследуемого штамма *Bacillus megaterium*

Был проведен анализ метаболических подсистем, т.е., наборов белков, которые совместно реализуют определенный биологический процесс, уникальных для генома *B. megaterium* (рис. 10).

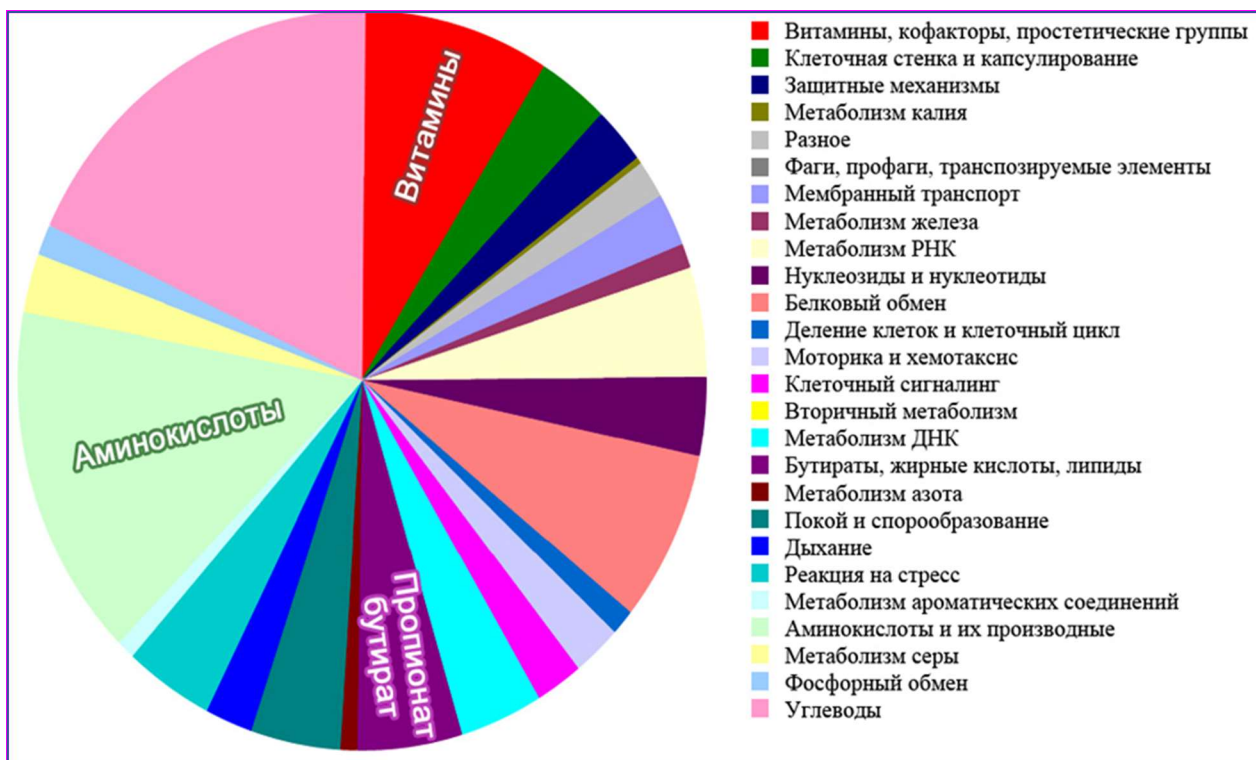


Рис. 10. Метаболические системы штамма бактерии *B. megaterium* согласно базе данных RAST на основе функциональной аннотации штамма

Более 45% генов *B. megaterium* вовлечены в функции транспорта и метаболизма аминокислот, транскрипции, трансляции, транспорта и метаболизма углеводов, белков. Согласно аннотации, исследуемый штамм обладает полными метаболическими путями, включая гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и пентозофосфатный путь.

Факт того, что значительное количество генов (17,5%) связано с метаболизмом углеводов, вполне закономерно, поскольку доказано, что *Bacillus* spp. продуцируют широкий спектр антибиотикоподобных соединений нерибосомной природы и органических кислот, для синтеза которых требуется активный углеводный обмен, в ходе которого образуются ключевые субстраты. Среди множества синтезируемых белков важную роль играют ферменты, определяющие поступление в клетку сахаров, и этапы их окисления (пермеазы, гидролазы). В результате этих процессов образуются, в частности, пируват, 2-оксо-глутарат, оксалоацетат и ацетил-КоА, которые являются предшественниками синтеза жирных кислот, аминокислот, поликетидов и целого ряда других жизненно важных метаболитов.

Важно присутствие в геноме значительного количества (более 20%) генов, осуществляющих реализацию взаимодействия с окружающей средой: связанных с формированием клеточной оболочки и капсулированием, моторикой и хемотаксисом, клеточным сигналингом, реакцией на стресс и пр., что указывает на высокий потенциал пробиотической активности. Вероятно, данный набор генов может способствовать выживанию штамма в условиях агрессивной среды желудочно-кишечного тракта, а также способствовать адгезии к клеткам эпителия хозяина. Значительная доля генома аннотировалась, как связанная с синтезом витаминов, в частности В2, В1, В9 и биотина, играющих важную роль во многих обменных процессах в макроорганизмах.

Определены ключевые генетические локусы, детерминирующие синтез таких антимикробных метаболитов, как жирные кислоты, каносамин, относящийся к группе

аминогликозидов, а также поликетидные ансамициновые бактериоцины из группы макролидов.

Идентификацию ключевых компонентов путей продукции антимикробных компонентов у штамма *B. megaterium* проводили с использованием базы данных Kegg Pathway (рис. 11).

Так, в составе генома секвенированного нами штамма *B. megaterium* локализованы гены, связанные с продукцией белков (FabD, FabF, FabG, FabZ, FabI и др.), участвующих в синтезе алифатических ненасыщенных карбоновых кислот с числом углеродных атомов от 3 до 18, в частности, масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой. В качестве иллюстрации метаболические карты синтеза некоторых карбоновых кислот у штамма *B. megaterium* представлены на рисунке 11.

Согласно базе данных KEGG (рис. 11), предшественники для биосинтеза жирных кислот у *B. megaterium* B-4801 образуются из пула ацетил-КоА. На первом этапе происходит перенос ацетильной группы от ацетил-КоА на молекулу ацилпереносящего белка (АПБ). Ацетил-АПБ выполняет функцию затравки, к которой присоединяется С2-фрагмент. Донором С2-фрагмента служит молекула малонил-АПБ, синтезирующаяся также из ацетил-КоА. Эту реакцию катализирует фермент FabD (малониловый СОА-ациловый белок-носитель трансацилаза, EC 2.3.1.39).

Дальнейший ход превращений у штамма *B. megaterium* имеет некоторые отличия для различных жирных кислот, поэтому дальнейшие превращения будут описаны нами на примере масляной кислоты. В результате присоединения С2-фрагмента к ацетил-АПБ образуется ацетоацетил-АПБ. Судя по данным базы KEGG, белок FabF катализирует конденсацию ацетил-КоА с малонил-АПБ для получения ацетоацетил-АПБ.

На следующем этапе у штамма *B. megaterium* с помощью серии ферментативных реакций с участием белков FabG, FabZ, FabI (FabK, FabL) происходит восстановление окисленных углеродных атомов ацетоацетил-АПБ, приводящее через стадии метаболитов-предшественников к образованию бутирила-АПБ – радикала масляной кислоты. Завершающую стадию в биосинтезе жирных кислот катализирует фермент FabI (синонимы FabK, FabL), инициирующий уменьшение 2,3-двойной связи в производных эноил-АПБ.

Таким образом, практически все основные ферменты, ответственные за образование жирных кислот (С3–С18), были выявлены у секвенированного нами штамма *B. megaterium*.

Данные, полученные на геномном уровне, явились дополнительным подтверждением того, что штамм *B. megaterium* обладает потенциальными пробиотическими свойствами, поскольку антимикробная активность указанных кислот подтверждена исследованиями. Так, широко известна выраженная антимикробная активность масляной кислоты в отношении *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Str. suis* (Kovanda et al., 2019). Исследования (Huang et al., 2011) показали, что ряд жирных кислот, в частности, капроновая, каприловая, каприновая, лауриновая и миристиновая, проявляли антагонизм в отношении *Streptococcus mutans*, *Str. gordonii*, *Str. sanguis*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis*. Прабхадеви с соавт. (Prabhadevi et al., 2012) отмечали антимикробную активность стеариновой кислоты, Рахман с соавт. (Rahman et al., 2014) – пальмитиновой.

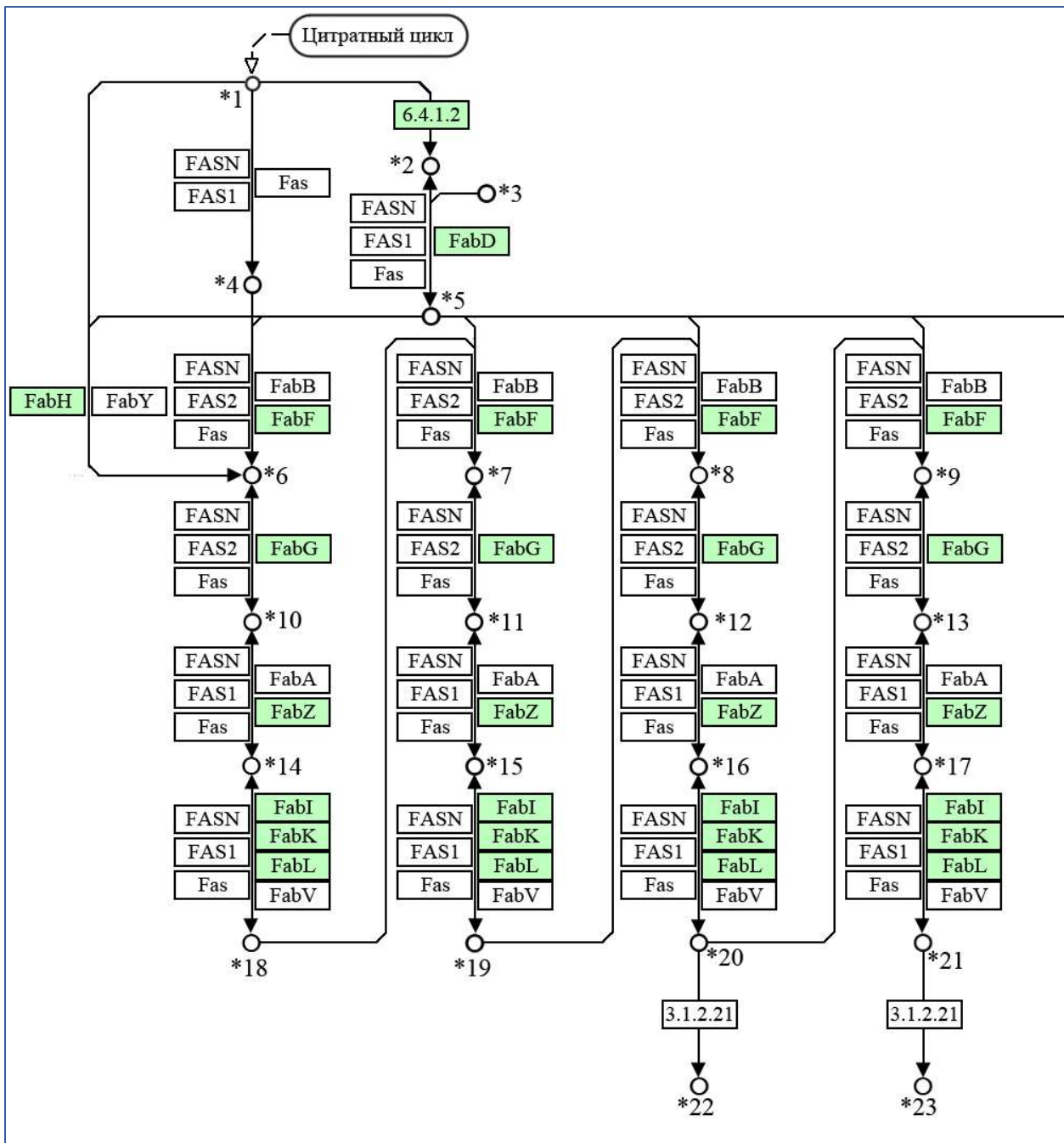


Рис. 11. Метаболические пути, приводящие к образованию жирных кислот и их предшественников у штамма бактерии *B. megaterium* B-4801: 1 – Ацетил-КоА, 2 – Малонил-КоА, 3 – Ацилпереносящий белок (АПБ), 4 – Ацетил-[АПБ], 5 – Малонил-[АПБ], 6 – Ацетоацетил-[АПБ], 7 – 3-Оксогексаноил-[АПБ], 8 – 3-Оксооктаноил-[АПБ], 9 – 3-Оксодеcanoил-[АПБ], 10 – (R)-3-Гидроксибутаноил-[АПБ], 11 – (R)-3-Гидроксигексаноил-[АПБ], 12 – (R)-3-Гидроксиоктаноил-[АПБ], 13 – (R)-3-Гидроксидеcanoил-[АПБ], 14 – Бут-2-эноил-[АПБ], 15 – Транс-гекс-2-эноил-[АПБ], 16 – Транс-окт-2-эноил-[АПБ], 17 – Транс-дек-2-эноил-[АПБ], 18 – Бутирил-[АПБ], 19 – Гексаноил-[АПБ], 20 – Октаноил-[АПБ], 21 – Деканоил-[АПБ], 22 – Каприловая кислота, 23 – Каприновая кислота

Интересно отметить, что у штамма бактерии *B. megaterium* B-4801 обнаружен целый кластер генов (Asm22–24, Asm43–45, Asm47), связанных с биосинтезом бактериоцина каносамина, относящегося к группе аминогликозидов, а также поликетидных ансамициновых антибиотиков из группы макролидов. Так, гены Asm43–45 ассоциированы с биосинтезом

антимикробного вещества каносамина (3-амино-3-дезоксид-Д-глюкозы) через промежуточное звено – УДП- α -Д-каносамин.

Каносамин и УДП- α -Д-каносамин являются также и промежуточными звеньями в биосинтезе 3-амино-5-гидроксибензойной кислоты. 3-амино-5-гидроксибензойная кислота используется в клетках микроорганизмов в качестве стартового блока для сборки углеродного каркаса прекурсоров ансамициновых антибиотиков при помощи модулярной поликетидной синтазы I. Ансамицины – это класс бактериальных макроциклических поликетидов, продуцируемых, главным образом, представителями филума Actinobacteria и рода *Bacillus*. Доказано, что ансамицины проявляют широкий спектр антимикробной активности. Для реализации синтеза 3-амино-5-гидроксибензойной кислоты у штамма бактерии *B. megaterium* обнаружен фермент транскетолаза, а также ряд генов, в частности Asm47, Asm23 и Asm24.

Интересно, что у штамма *Bacillus megaterium* был выявлен целый набор специфических генов, благодаря которым он способен адаптироваться, выживать, эффективно увеличивать численность и вытеснять патогены в кишечнике. Выяснилось, что выстилать и колонизировать поверхность слизистой кишечника штамму позволяет способность формировать биопленки, устойчивые к агрессивным факторам внешней среды. 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. Штаммы бактерий, не обладающие подобными генами, могут быть выведены из организма транзитом.

3.3. Результаты хроматографических исследований

Интересно, что полученные результаты были подтверждены методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии. В культуральной жидкости штаммов бактерий (рис. 12) были обнаружены пропионовая, масляная кислоты и их производные, ацетоуксусная кислота, аминокислоты, витамины (например, B₂ и др.), активные пептиды (ферменты) и другие биологически активные вещества. Количество продуцируемых метаболитов было значительным. Так, например, *Bacillus megaterium* способен продуцировать 26 мг/мл масляной кислоты.

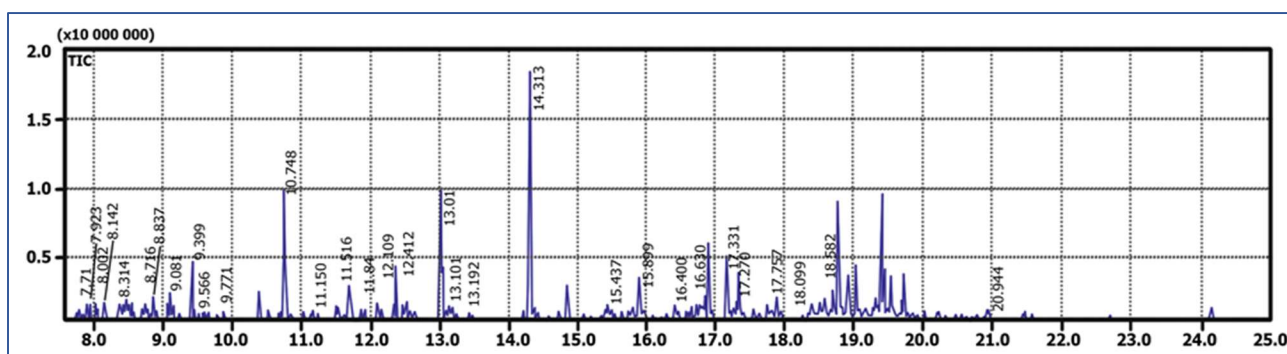


Рис. 12. Обзорная хроматограмма метаболитов в культуральной жидкости *Bacillus megaterium* в составе Профорта®

3.4. Выживаемость пробиотических бактерий в пищеварительной системе

У бактерий в составе большинства имеющихся на рынке пробиотиков отсутствует свойство устойчивости к агрессивным факторам среды ЖКТ. Поэтому до кишечника, где они и призваны работать, бактерии не доходят живыми или доходят, но в ничтожном количестве.

Была проведена экспериментальная оценка выживаемости бактерий *Enterococcus faecium* и четырех штаммов *Bacillus* spp., составляющих основу пробиотиков ООО «БИОТРОФ», при имитации их продвижения по пищеварительному тракту. При селекции бактерий в процессе разработки пробиотиков производители обязательно учитывают свойства устойчивости к соляной кислоте желудка, пищеварительным ферментам и желчным кислотам кишечника.

Изучение выживаемости микроорганизмов проводили в соответствии с методикой Дармова и др. (2011). При этом учитывалось влияние совокупности повреждающих физико-химических факторов ЖКТ: желудочного сока, содержащего соляную кислоту и пепсин, и ферментов кишечника (табл. 3). Для сравнения в таблице 3 представлены также результаты, полученные в 2011 г. по данной методике учеными кафедры микробиологии Вятского государственного университета (Дармов и др., 2011). Исследователями была проведена оценка выживаемости бактерий рода *Lactobacillus*, входящих в состав нескольких коммерческих пробиотиков.

Таблица 3

Выживаемость пробиотических бактерий в желудочно-кишечном тракте, КОЕ/мл

№	Микроорганизм	Сохранность титра в желудке		Сохранность титра в кишечнике	
		Начальный титр	Титр после инкубации	Начальный титр	Титр после инкубации
Данные ООО «БИОТРОФ» (2019 г.)					
1	<i>Enterococcus faecium</i> (Профорт®)	$2,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$4,9 \times 10^6$
2	<i>Bacillus</i> spp. № 1 (Профорт®)	$4,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^7$
3	<i>Bacillus</i> spp. № 2	$4,0 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	$8,0 \times 10^7$
4	<i>Bacillus</i> spp. № 3	$2,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^8$
5	<i>Bacillus</i> spp. № 4	$5,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$5,6 \times 10^7$
Данные Дармова с соавт. (Дармов и др., 2011)					
6	<i>Lactobacillus</i> spp. № 15/6	$2,1 \times 10^9$	4×10^5	4×10^5	$2,0 \times 10^3$
7	<i>Lactobacillus</i> spp. № 125-2	$4,6 \times 10^9$	$2,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^2$
8	<i>Lactobacillus</i> spp. № 125-6	$3,7 \times 10^9$	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$

Проверка жизнеспособности пробиотических бактерий при прохождении желудка показала, что сохранность *Enterococcus faecium* была на достаточно высоком для достижения пробиотического эффекта уровне, сохранность же четырех исследованных штаммов бактерии *Bacillus* spp. составляла 100%. Позитивные результаты связаны с тем, что бактерии *Bacillus*

spp. и *Enterococcus faecium* обладают механизмами выживаемости в неблагоприятных условиях окружающей среды, толерантность *Bacillus spp.* усилена способностью формировать споры, имеющие многослойную защитную оболочку. Интересно, что условия, имитирующие кишечник, не только не оказали ингибирующего влияния на рост бактерий *Bacillus spp.* и *Enterococcus faecium*, но даже стимулировали их рост! Этот результат закономерен, поскольку данные микроорганизмы – это представители индигенной (собственной) микрофлоры животных и птиц. Их метаболизм в процессе эволюции был адаптирован для существования в подобных условиях, а широкие ферментативные возможности позволяют использовать разнообразные питательные вещества для роста и развития.

Для бактерий рода *Lactobacillus* при инкубации на модельной среде, имитирующей прохождение желудка, было продемонстрировано колоссальное падение титра жизнеспособных клеток (аж на 3–4 порядка!), выживаемость в условиях кишечника также оказалось крайне низкой: у штамма бактерии *Lactobacillus spp.* №125-2 титр снизился на 4 порядка от исходной величины. Дело в том, что бактерии рода *Lactobacillus* имеют слабые механизмы выживания в агрессивных условиях желудочно-кишечного тракта и проявляют жесткие потребности к питательным веществам, их рост может быть легко ингибирован многими веществами, присутствующими в ЖКТ.

3.5. Результаты испытаний кормовой добавки Профорт® в производственных условиях

Эффективность пробиотика Профорт® была многократно подтверждена в условиях производства на промышленной высокопродуктивной сельскохозяйственной птице.

Как показали мониторинговые исследования на 14 птицеводческих хозяйствах методом NGS-секвенирования, среднее содержание (доля среди других представителей микробиоты) патогенов в кишечнике птиц значительно варьировало в зависимости от применения пробиотика Профорт® (табл. 4). Использование биопрепарата Профорт® способствовало снижению количества возбудителей гастроэнтеритов, заболеваний респираторной системы, опорно-двигательного аппарата, септицемий до 980 раз. Важным результатом явилось то, что применение пробиотиков полностью сдерживало развитие патогенных бактерий *Pasteurellaceae*, как у бройлеров, так и у несушек. На бройлерных птицефабриках удалось остановить рост в кишечнике *Enterococcus cecorum*.

Таблица 4

Средняя доля патогенов среди других представителей микробиоты кишечника сельскохозяйственной птицы, %

Патогены	Бройлеры		Несушки	
	Без пробиотиков	Пробиотик Профорт®	Без пробиотиков	Пробиотик Профорт®
<i>Streptococcus spp.</i>	0,54	0,05 (↓ в 10,8 раз)	0,35	0,09 (↓ в 3,9 раз)
Патогенные <i>Clostridium spp.</i>	0,13	0,06 (↓ в 2,2 раза)	0,19	0,08 (↓ в 2,4 раза)
<i>Peptococcus spp.</i>	0,04	0,02 (↓ в 2 раза)	1,07	0,09 (↓ в 11,9 раз)
<i>Helicobacter spp.</i>	0,01	0,05	0,06	0,05 (↓ в 1,2 раза)
<i>Sutterella spp.</i>	0,98	0,001 (↓ в 980 раз)	0,27	0,05 (↓ в 5,4 раза)

Энтеробактерии	8,7	1,3 (↓ в 6,7 раз)	0,2	0,1 (↓ в 2 раза)
<i>Enterococcus cecorum</i>	0,01	Отсутствовали	0,07	0,06 (↓ в 1,2 раза)
Erysipelotrichales	0,49	0,07 (↓ в 7 раз)	0,17	0,19
Pasteurellaceae	0,01	Отсутствовали	0,006	Отсутствовали
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,02	0,01 (↓ в 2 раза)	0,003	0,01
<i>Campylobacter</i> spp.	0,004	Отсутствовали	0,22	0,04 (↓ в 5,5 раз)
Mycoplasmatales	0,04	0,008 (↓ в 5 раз)	0,01	0,003 (↓ в 3,3 раза)
<i>Rickettsia</i> spp.	0,01	Отсутствовали	0,005	Отсутствовали

На рисунке 13 представлены результаты изучения микробиома слепых отростков кишечника птиц методом NGS-секвенирования. Птица первой группы получала пробиотик Профорт[®], второй – пробиотик иностранного производства. В рацион третьей группы (контроль) пробиотики не вводили. В группе с пробиотиком иностранного производства и в группе контроля наблюдалось присутствие значительного количества патогенных форм, содержание которых превышало нормы для здоровой птицы. В кишечнике бройлеров этих групп, в отличие от группы с Профортом[®], были детектированы опасные виды, способные вызывать серьезные заболевания эпизоотического характера. Среди них возбудитель энтерита *Enterococcus cecorum*, который в ассоциации с бактериями семейства Burkholderiaceae приводит к воспалительным заболеваниям суставов. *Campylobacter coli* и *Pasteurella pneumotropica* – возбудители энтерита. *Helicobacter pullorum* – возбудитель воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Применение пробиотика Профорт[®] способствовало нормализации состава микробиома, а именно вытеснению условно-патогенных и патогенных форм из кишечника птицы.

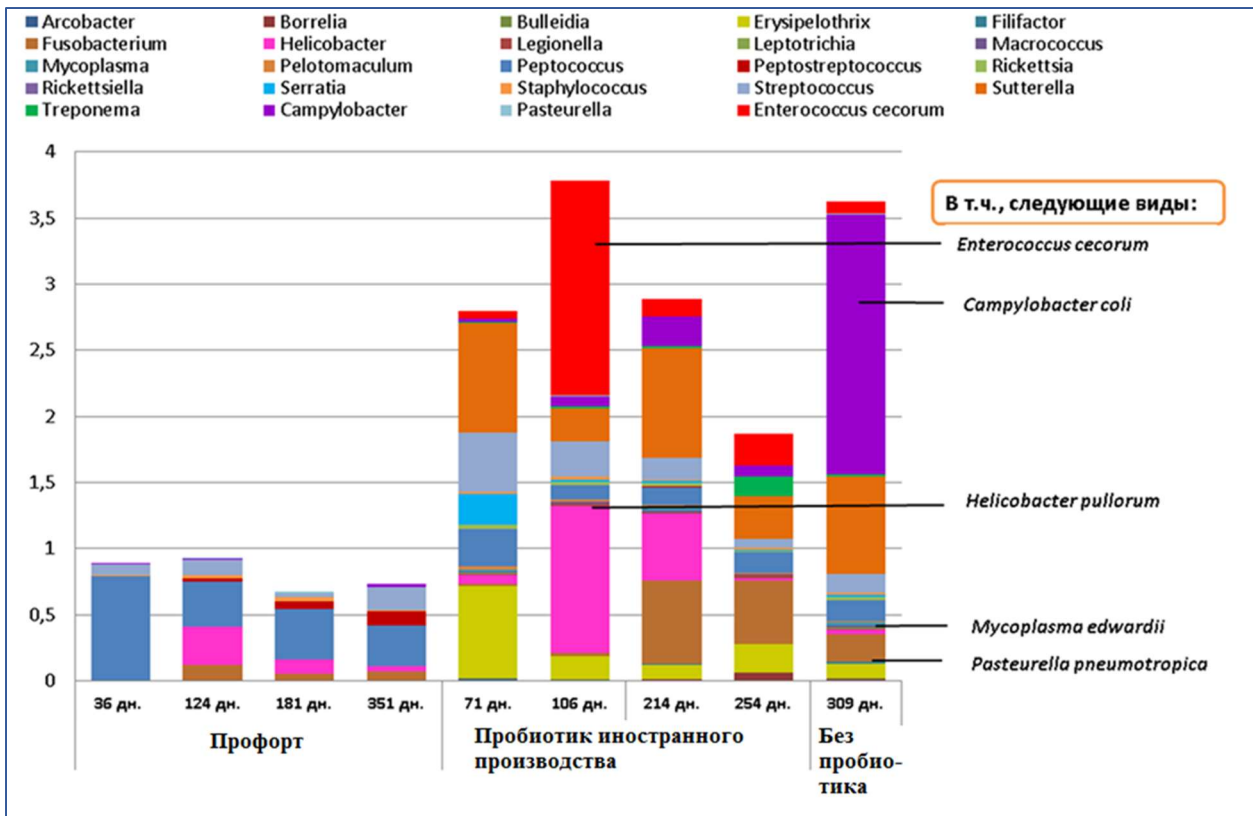


Рис. 13. Содержание патогенных форм в кишечнике бройлеров, %

В опыте на молодняке кур-несушек, проведенном на ведущей птицефабрике, за 20 недель применения Профорта® падеж снизился с 4,7 до 1,2%, то есть в 3,9 раза, по сравнению с контролем (рис. 14). Это связано, в частности, с 10-кратным снижением присутствия в кишечнике птицы патогенных форм, с которыми не смогли справиться даже кормовые антибиотики.

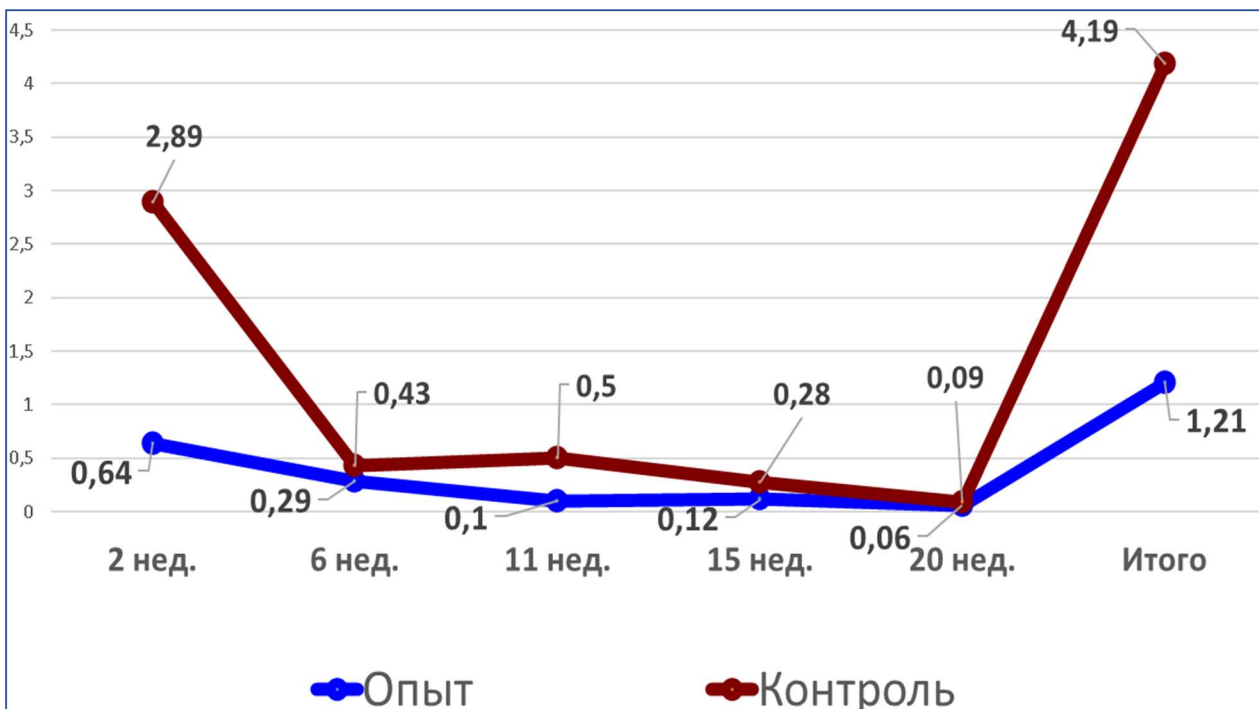


Рис. 14. Снижение (%) падежа кур-несушек на птицефабрике: Опыт – Профорт®, Контроль – без добавок

Заключение: Рекомендации по использованию кормовой добавки

В птицеводстве препарат вводить в комбикорма из расчёта 500 г на 1 тонну комбикорма.

Кормовая добавка Профорт® совместима с лекарственными средствами и другими кормовыми добавками.

Форма поставки

Профорт® выпускается в сухом виде в форме порошка, адсорбированный на подсолнечном шроте или отрубях, расфасованных в мешки по 20 кг.

Срок хранения – 9 месяцев от даты выпуска.

Профорт® при производстве комбикорма выдерживает **гранулирование при температуре до 85°C**.

Свести к минимуму применение антибиотиков без ущерба для производителя мяса и яйца птицы возможно даже на крупных промышленных предприятиях с большой плотностью поголовья птицы. В первую очередь, следует отказываться от антибиотиков, предназначенных для профилактических целей и стимуляции роста. Эту роль можно и нужно доверить безопасным альтернативным вариантам. Представляется актуальным использование биопрепаратов, которые объединяют достоинства разных штаммов микроорганизмов и полезных бактериальных метаболитов в одном препарате для достижения синергетического эффекта. Результат от применения таких препаратов не уступает по эффективности антибиотикам, но исключает негативные последствия от их использования: аккумуляция в продукции, негативное воздействие на иммунитет и микробиоту кишечника. Применение таких прогрессивных технологий будет способствовать повышению продуктивности и срока хозяйственного использования сельскохозяйственной птицы.

Список литературы

- Дармов И.В. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях *in vitro* / И.В. Дармов [и др.] // Эксперимент. и клин. гастроэнтерол. – 2011. – № 9. – С. 96–101.
- Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И., Романова Ю.М., Боев Б.В. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. – М. 1998.
- Ющенко Г. В. Иерсиниоз и псевдотуберкулез // Эпидемиологический процесс как социально-экономическая система. – М., 1986.
- Alakomi H.L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2001–2005 (doi:10.1128/aem.66.5.2001-2005.2000).

- Begley M., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 5451–5460 (doi: 10.1128/AEM.00730-09).
- Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 302 (doi: 10.3389/fmicb.2019.00302).
- Chuanqing Z., Jiang A.U., Huang A., Qi W. Cao X., Guangxiang Studies on the acid-production characteristics of *Bacillus megaterium* strain P17. *Conference Paper in AIP Conference Proceedings*, 2017, 1839(1): 020054, (doi: 10.1063/1.4982419).
- Eppinger M., Boyke B., Mitrick A.J., Janaka N.E., Kirthi K.K., Koenig S.S.K., Creasy H.H., Rosovitz M.J., Riley D.R., Daugherty S., Martin M., Elbourne L.D.H., Paulsen I., Biedendieck R., Braun C., Grayburn S., Dhingra S., Lukyanchuk V., Ball B., Ul-Qamar R., Seibel J., Bremer E., Jahn D., Ravel J., Vary P.S. Genome Sequences of the Biotechnologically Important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4199–4213 (doi:10.1128/JB.00449-11).
- Hong H.A., Duc le H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 29: 813–835 (doi:10.1016/j.femsre.2004.12.001).
- Huang C.B., Alimova Y., Myers T.M., Ebersole J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, 2011, 56(7): 650–654 (doi:10.1016/j.archoralbio.2011.01.011).
- Khatri I., Sharma G., Subramanian S. Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 307 (doi:10.1186/s12866-019-1680-7).
- Kovanda L., Zhang W., Wei X., Luo J., Wu X., Atwill E.R., Vaessen S., Li X., Liu Y. In Vitro Antimicrobial Activities of Organic Acids and Their Derivatives on Several Species of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Molecules*, 2019, 24(20): 3770 (doi:10.3390/molecules24203770).
- Li P., Tian W., Jiang Z., Liang Z., Wu X., Du B. Genomic Characterization and Probiotic Potency of *Bacillus* spp. DU-106, a Highly Effective Producer of L-Lactic Acid Isolated From Fermented Yogurt. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:2216 (doi:10.3389/fmicb.2018.02216).
- Liu L., Yang L., Jing Z., Wei Z., Zhemin Z., Jie L., Xiaomin L., Lei W., Jian C. Complete Genome Sequence of the Industrial Strain *Bacillus megaterium* WSH-002. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (22) 6389–6390; (doi:10.1128/JB.06066-11).
- Ortiz A., Sansinenea E. Succinic Acid Production as Secondary Metabolite from *Bacillus megaterium* ELI24. *The Natural Products Journal*, 2020, 10(2) (doi: 10.2174/2210315509666190410153811).
- Poudel P., Tashiro Y., Miyamoto H., Miyamoto H., Okugawa Y., Sakai K. Direct starch fermentation to L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain, *Bacillus* spp. 2015, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42: 143–149 (doi:10.1007/s10295-014-1534-00).
- Prabhadevi V., Sahaya S.S., Johnson M., Venkatramani B., Janakiraman N. Phytochemical studies on *Allamanda cathartica* L. using GC-MS. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(2): S550–S554 (doi: 10.1016/S2221-1691(12)60272-X).
- Rahman M.M., Ahmad S.H., Mohamed M.T., Ab Rahman M.Z. Antimicrobial compounds from leaf extracts of *Jatropha curcas*, *Psidium guajava*, and *Andrographis paniculata*. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 635240 (doi:10.1155/2014/635240).
- Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, 56: 845–857 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x).
- Vílchez J.I., Tang Q., Kaushal R., Wang W., Suhui L., Danxia H., Zhaoqing C., Heng Z., Renyi L., Huiming Z. Complete Genome Sequence of *Bacillus megaterium* Strain TG1-E1, a Plant Drought Tolerance-Enhancing Bacterium. *Microbiology Resource Announcements*, 2018, 7(12): e00842-18 (doi:10.1128/MRA.00842-18).