

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Николаева А.А.¹, Марданова А.М.², Хадиева Г.Ф.², Лутфуллин М.Т.²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,

²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань,
azazel1212@rambler.ru

Аннотация. В настоящей работе представлены данные, полученные в ходе исследования свойств пробиотика двух штаммов *Bacillus subtilis* GM2 и GM5. Показано, что споры штаммов *B. subtilis* GM2 и GM5 обладают устойчивостью к высокой концентрации куриной желчи. Применение пробиотиков приводит к повышению прироста живой массы цыплят-бройлеров на 4,16% и 10,76% относительно контроля. Использование пробиотиков приводит к увеличению количества молочнокислых бактерий в содержимом тонкого кишечника в 66 раз относительно контроля для GM5 и 48 раз для GM2. Из содержимого слепого и тонкого кишечника цыплят-бройлеров были выделены и идентифицированы представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* и *Clostridiaceae*.

Введение. Модуляция микрофлоры животного – индикатор и один из способов регуляции жизнеспособности живого существа. Раннее широко использовались противомикробные лекарственные препараты, однако длительное использование антибиотиков в системе производства пищевых продуктов привело к развитию устойчивых к противомикробным препаратам патогенов. Альтернативным методом поддержания равновесия кишечной микрофлоры животных и их иммунитета являются пробиотики. Современная индустрия птицеводства широко использует в качестве неотъемлемого компонента фармакологического обеспечения пробиотические препараты для повышения усвояемости кормов, неспецифического иммунитета и стимуляции развития птиц [1].

Целью работы была характеристика влияния пробиотиков на основе спор штаммов *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 на состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) цыплят-бройлеров.

Материалы и методы. Объектом исследования были штаммы *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 с высокой антагонистической активностью, выделенные из ризосферы картофеля [2], их пробиотические свойства *in vitro* были охарактеризованы ранее [3].

Для микробиологического анализа содержимого ЖКТ цыплят-бройлеров проводили посев содержимого слепого кишечника цыплят на среду МПА, на дифференциальные среды ЭНДО и висмут-сульфитный агар (ВСА) для изучения бактерий группы кишечной палочки (БГКП) и на капустный агар для молочнокислых бактерий (МКБ). Культивирование бактерий проводилось в термостате при температуре 30 и 37°C. При необходимости бактерии

культивировали в термостате-шейкере при 30 и 37°C и интенсивности качания 200 об/мин.

Споры бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 были получены по методу, описанному в статье [3]. Устойчивость спор бактерий к желчи исследовали *in vitro* по методу, описанному в работе [4]. Использовали желчь цыплят-бройлеров, которую стерилизовали фильтрованием через стерильный фильтр Millipore (0,22 мкм). Споры вносили в среду LB после добавления желчи (1 и 10%) и доведения pH до 7.5. Суспензию спор инкубировали при 40°C в течение 6 ч и затем определяли КОЕ/мл.

Исследование влияния *B. subtilis* GM2 и GM5 на цыплят-бройлеров проводили в условиях крестьянско-фермерского хозяйства «Лачын». Для опыта были отобраны цыплята кросса Кобб-500 в количестве 90 голов. Цыплята содержались в вентилируемых клеточных батареях при температуре 35-36°C с искусственным освещением в течение 24 час в сутки. Были сформированы опытная и две опытные группы по 30 цыплят. Опытные группы получали споры *B. subtilis* GM2 и GM5 в концентрации 1×10^7 КОЕ/г корма. В ходе эксперимента проводилось ежедневное взвешивание птицы опытных и контрольных групп, определялся общий вес, среднесуточные приросты массы тела и сохранность поголовья. Количество потребляемого корма определялось путем измерения остатка корма на еженедельной основе с начала эксперимента

Образцы содержимого кишечника 3 цыплят из каждой группы отбирали в стерильные фальконы после убоя на 42 сутки. К 1 г содержимого слепого и тонкого кишечника добавляли 9 мл стерильной воды, получали ряд серийных десятикратных разведений из суспензии до разбавления исходного материала к $1:10^9$. Делали глубинный посев по 1 мл суспензии на среды LA и капустный агар и поверхностный посев 0.1 мл суспензии шпателем Дригальского на среды ЭНДО и ВСА. Чашки с посевами инкубировали в термостате при 37°C в течение 2-3 суток.

Для определения общего количества бактерий использовали разведения $1:10^4$ - $1:10^5$ для анализа содержимого тонкого кишечника и $1:10^8$ - $1:10^9$ для слепого кишечника. Для определения количества МКБ использовали разведения $1:10^2$ - $1:10^4$ для анализа содержимого тонкого кишечника и $1:10^5$ для слепого кишечника. Для определения количества БГКП использовали разведения $1:10^2$ - $1:10^3$ для анализа содержимого тонкого кишечника и $1:10^4$ - $1:10^5$ для слепого кишечника.

Колонии различные по морфологическим признакам были отобраны, выделены в чистую культуру и идентифицированы на MALDI BioTyper (Bruker Daltonik).

Результаты. Для оценки пробиотических свойств *B. subtilis* GM2 и GM5 исследовали устойчивость спор в куриной желчи. Устойчивость оценивали по количеству КОЕ, сохраняющих жизнеспособность после инкубации в растворе желчи. Суспензии спор *B. subtilis* GM2 и GM5 (4×10^7 КОЕ/мл) инкубировали в

течение 6 ч в среде LB, содержащей 1 и 10% желчи, после чего методом посева оценивали жизнеспособность спор. В среде, содержащей 1% желчь, жизнеспособность сохраняли около 60% спор штаммов GM2 и GM5. Инкубация в присутствии 10% желчи приводила к гибели 70 и 56% спор штаммов GM2 и GM5 относительно контроля соответственно. Таким образом, установили, что штамм GM5 более устойчив к высокой концентрации желчи, по сравнению со штаммом GM2.

Исследовали влияние добавления спор *B. subtilis* GM2 и GM5 в корма на прирост цыплят и потребление кормов. Для этого использовали цыплят-бройлеров кросса Кобб-500: контрольная группа получала стандартный корм, опытная группа 1 получала с кормом споры шт GM2, а опытная группа 2 - GM5. Ежедневно измеряли вес цыплят и установили, что с 21 по 42 сутки прирост живой массы цыплят опытных групп 1 и 2 был значительно выше и превышал контроль на 4,16% и 10,76%, $p < 0,05$ соответственно. По-видимому, прирост массы у цыплят-бройлеров в опытных группах достигается в основном благодаря нормализации состава микрофлоры и снижения активности патогенных форм бактерий. Полученные данные позволяют нам сделать вывод о том, что добавление спор бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 в комбикорм бройлеров приводит к улучшению потребления корма, что может быть обусловлено пробиотическими свойствами бактерий.

Был проведён микробиологический анализ тонкого и слепого кишечника цыплят-бройлеров на 42 сутки роста. При добавлении в корм спор *B. subtilis* GM5 происходило увеличение МКБ в содержимом тонкого кишечника в 66 раз, а в слепом кишечнике – в 2 раза относительно контрольной группы. Применение спор *B. subtilis* GM2 приводило к увеличению количества МКБ в тонком кишечнике в 48 раз относительно контроля и в – 2,2 раза в слепом кишечнике. Значение ОМЧ было относительно на одинаковом уровне в обеих опытных группах по сравнению с контрольной группой. Количество БГКП в тонком кишечнике незначительно увеличивалось в опытных группах в сравнении с контролем.

Из содержимого слепого и тонкого кишечника были выделены и идентифицированы бактерии – представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* и *Clostridiaceae*. Изоляты, выделенные из тонкого кишечника, в основном представлены родами *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и *Enterococcus*. Из слепого кишечника были выделены и идентифицированы изоляты, относящиеся к родам *Enterococcus*, *Filifactor*, *Clostridium* и *Bacillus*. Таким образом, на основе MALDI анализа была определена видовая принадлежность выделенных из ЖКТ цыплят штаммов. Из тонкого кишечника были определены до вида 4 изолята: *Pseudomonas fulva*, *Enterococcus hirae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Из слепого кишечника были идентифицированы 8 изолятов: *Clostridium cadaveris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fulva*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Micrococcus luteus*, *Filifactor villosus*.

Таким образом, штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 являются перспективными для использования в качестве пробиотиков по ряду основных свойств: штаммы устойчивы к действию желчи ЖКТ и способны к росту в широком диапазоне рН, при кормлении цыплят-бройлеров проявили положительный эффект на прирост массы тела птицы, приводили к увеличению числа молочнокислых бактерий в тонком отделе кишечника.

Исследования выполнены в рамках проекта РНФ № 16-16-04062 по теме «Разработка новых подходов с применением бактериальных ферментов и пробиотиков для повышения усвояемости корма сельскохозяйственной птицы на основе изучения физиологии ее пищеварения».

Литература

1. Панин А.И. Пробиотики как неотъемлемый компонент рационального кормления животных и птиц // Птицы и птицепродукты. 2008. № 3. С. 13–16.
2. Хадиева Г.Ф., Лутфуллин М.Т., Мочалова Н.К., Ленина О.А., М.Р.Шарипова, Марданова А.М. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики // Микробиология. 2018. Т. 87, № 4. С. 356–365.
3. Cenci G., Trotta F., Caldini G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii* // Appl. Microbiol. 2006. V. 101. P. 1208–1215.
4. Mardanova A. M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi // Agricultural Sciences. 2017. V. 8. P. 1-20.