

**БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ШТАММА *Lactobacillus plantarum* L-211
ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА. Сообщение II. КОРМЛЕНИЕ ПОРОСЯТ*****В.И. ФИСИНИН¹, Е.А. АРТЕМЬЕВА², И.И. ЧЕБОТАРЕВ³, Г.Ю. ЛАПТЕВ⁴,
И.Н. НИКОНОВ⁴, Л.А. ИЛЬИНА⁴, Н.Г. МАШЕНЦЕВА⁵, А.В. САВИНОВ³,
Д.Л. КЛАБУКОВА⁵, Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ⁴, Н.И. НОВИКОВА⁴**

Недостаток лизина в рационе свиней отрицательно сказывается на аппетите, продуктивности, обмене веществ и иммунитете животных. Большинство кормов для свиней дефицитны по содержанию лизина. Использование синтетических аминокислот в качестве добавок значительно удорожает комбикорма. Перспективным представляется разработка биопрепаратов на основе штаммов микроорганизмов, синтезирующих лизин в желудочно-кишечном тракте животных. Наиболее известные продуценты лизина — *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli* и представители рода *Corynebacterium* относятся к условно-патогенной микрофлоре, способной вызывать оппортунистические инфекции. В представленном исследовании мы впервые изучили изменения в бактериальном сообществе кишечника и продуктивные показатели поросят породы крупная белая (ООО «Новгородский беком», Новгородская обл.) под влиянием продуцента лизина — штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 (ООО «Биореактор», г. Москва). Таксономический состав микроорганизмов определяли с помощью T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) анализа. Наблюдение проводили на двух группах поросят в период с 28- до 84-суточного возраста — контрольной ($n = 715$) и опытной ($n = 657$). Поросятам из опытной группы на фоне основного рациона, соответствующего нормам для породы, один раз в 7 сут выпаивали препарат на основе штамма *L. plantarum* L-211 (не менее 10^9 КОЕ/гол.). Микробное сообщество толстого отдела кишечника поросят характеризовалось таксономическим разнообразием и включало ряд неидентифицированных фило типов. В нем доминировали представители филума *Firmicutes*, включающего преимущественно бактерии из класса *Clostridia* с целлюлозо- и амилолитическими свойствами, а также из порядка *Negativicutes*, для которого характерна способность ферментировать кислоты. В меньшем количестве присутствовали микроорганизмы, принадлежащие к филумам *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria*. Численность бактерий рода *Lactobacillus* у поросят оказалась ниже, чем предполагалось ранее, кроме того, отмечалось полное отсутствие энтерококков и бифидобактерий, которые принято относить к автохтонной микробиоте толстого отдела кишечника у животных и птицы. Включение штамма, синтезирующего лизин, в рецептуру комбикорма приводило к высокому пробиотическому эффекту — достоверному увеличению численности родов *Lactobacillus* (в 2,94 раза, $P < 0,01$) и *Bacillus* (в 3,29 раза, $P < 0,01$), филы *Bacteroidetes* (в 5,29 раза, $P < 0,01$), класса *Clostridia* (в 2,05 раза, $P < 0,01$) на фоне снижения доли патогенов рода *Staphylococcus* и семейства *Campylobacteriaceae* (до значений ниже пределов чувствительности метода T-RFLP) и семейства *Pasteurellaceae* (в 1,41 раза, $P < 0,05$). При выпаивании поросятам препарата на основе штамма *L. plantarum* L-211 их сохранность, среднесуточный прирост живой массы ($P < 0,05$), а также эффективность конверсии корма повышались по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: лизин, микрофлора кишечника, поросята, бактериальное сообщество, T-RFLP, пробиотик, *Lactobacillus plantarum*, продуктивность, сохранность, конверсия корма.

В период дорастивания поросят происходит формирование их пищеварительной системы и интенсивный прирост живой массы, что важно для получения высокопродуктивного поголовья (1, 2). При этом особую роль играет полноценный аминокислотный состав рациона, в том числе по эссенциальным аминокислотам. С недостатком лизина связано снижение аппетита и продуктивности животных, потеря массы тела, нарушение кальцификации костной ткани, общее истощение и анемия (3, 4). Кроме того, происходит подавление иммунитета и повышается восприимчивость к инфекционным заболеваниям (5). Из-за дефицитности кормосмесей растительного происхождения по лизину их использование в кормлении свиней непродуктивно. Основным сырьем при производстве отечественных комбикормов для свиней служат дефицитные по лизину компоненты (зерновые, побочные продукты их переработки, подсолнечный шрот), поэтому,

* Работа выполнена в рамках соглашения с Министерством образования и науки Российской Федерации о предоставлении субсидии от 05.06.2014 г. № 14.579.21.0021 (RFMEFI57914X0021).

как правило, не удается обеспечить норму по лизину без использования синтетических аминокислот, что значительно удорожает комбикорма (6, 7).

Разработки биопрепаратов (пробиотиков), синтезирующих лизин в желудочно-кишечном тракте животных (8, 9) при скармливании, которые выполняются в России и за рубежом, рассматриваются как наиболее перспективный подход при формировании оптимальной кишечной микрофлоры. При этом в качестве продуцентов лизина преимущественно изучались *Brevibacterium lactofermentum*, *E. coli* и представители рода *Corynebacterium* (10-12), однако перечисленные микроорганизмы относятся к условно-патогенным и способны вызывать оппортунистические инфекции, вследствие чего их использование в качестве пробиотиков крайне нежелательно. Некоторые штаммы рода *Lactobacillus* также способны синтезировать лизин (8, 9, 13) и позитивно влияют на рост, качество туши, иммунитет животных (14, 15). Положительный эффект от применения лактобактерий в рационах свиней также связывают с синтезом органических кислот и бактериоцинов, подавляющих рост и развитие различных возбудителей заболеваний — сальмонелл, протеев, стафилококков, кишечной палочки, псевдомонад, стрептококков (15, 16).

В последние годы сообщается об успешном применении молекулярно-генетических подходов для изучения микробного сообщества пищеварительного тракта свиней, в том числе продемонстрированы различия в составе микробиоценоза здоровых свиней и животных с кишечными расстройствами (17, 18). Методы T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) и NGS (next generation sequencing) позволяют дать развернутую характеристику микробного сообщества, выявляя не только таксономические доминанты, но и минорные компоненты, в том числе некультивируемые микроорганизмы, доля которых в разных экосистемах может достигать 90 % (19, 20). Однако проведенные до настоящего времени исследования кишечного микробиома свиней единичны (21, 22), а данные относительно комплексного анализа бактериального сообщества и воздействия на него пробиотических штаммов лактобактерий отсутствуют. Штамм *Lactobacillus plantarum* L-211 описан как продуцент лизина с достаточно высоким выходом при культивировании (8, 9).

Мы впервые с помощью метода T-RFLP определили состав бактериального сообщества в толстом отделе кишечника поросят при выпаивании препарата лизин-продуцирующего штамма лактобактерий и выявили его высокую пробиотическую активность, что сопровождалось положительными изменениями зоотехнических показателей — повышением сохранности и среднесуточного прироста живой массы.

Целью настоящей работы было изучение влияния продуцента лизина — штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 на бактериальное сообщество кишечника и продуктивные показатели у поросят в период дорастивания.

Методика. Производственный опыт проводили на двух группах поросят породы крупная белая в период с 28- до 84-суточного возраста (ООО «Новгородский Бекон», Новгородская обл.). Содержание и кормление поросят из I (контроль, $n = 715$) и II ($n = 657$) групп осуществляли с соблюдением всех технологических показателей при равноценных составах комбикормов (ООО «Новгородский бекон», Новгородская обл.) по лизину, соответствующих нормам для породы крупная белая. Поросятам II группы дополнительно один раз в 7 сут выпаивали препарат на основе штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 (ООО «Биореактор», г. Москва) в количестве не менее 10^9 КОЕ/гол. Учитывали сохранность поголовья, живую массу поросят в возрасте 28 и 84 сут (индивидуальное взвешивание), ее среднесуточный прирост, потребление и затраты корма на 1 кг живой массы.

Отбор содержимого толстого отдела кишечника от трех поросят из

каждой группы для молекулярно-генетических исследований проводили в 84-суточном возрасте при убое со строгим соблюдением стерильности. T-RFLP-анализ состава бактериального сообщества проводили согласно описанию (23). Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США) с эубактериальными праймерами: 63F — CAGG-CCTAACACATGCAAGTC с меткой на 5'-конце (флуорофор WellRed D4, «Beckman Coulter, Inc.», США), 1492R — TACGGHTACSTTGTTCAGACTT. Флуоресцентно меченные ампликоны ДНК гена 16S рРНК очищали в соответствии с описанием (24), рестрикцию (30-50 нг) эндонуклеазами HaeIII, HhaI и MspI выполняли, следуя рекомендации изготовителя («Fermentas, Inc.», Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью SEQ™ 8000 («Beckman Coulter Inc.», США) согласно инструкции производителя. Принадлежность бактерий к филогенетической группе определяли в программе Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Данные обрабатывали с помощью дисперсионного анализа. Различия с контролем считали значимыми при $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$.

Результаты. T-RFLP анализ микробного сообщества толстого отдела кишечника поросят, где с участием кишечной микробиоты происходят важнейшие биохимические процессы переваривания углеводов корма, в том числе клетчатки, с образованием летучих жирных кислот (ЛЖК) и других метаболитов (25), выявил ряд таксономических групп (табл. 1).

1. Соотношение бактериальных таксонов (%) в толстом отделе кишечника у 84-суточных поросят породы крупная белая при выпаивании препарата на основе штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 ($\bar{X} \pm x$, ООО «Новгородский бекон», Новгородская обл.).

Таксон	I группа (контроль, $n = 3$)	II группа (опыт, $n = 3$)
Фила <i>Bacteroidetes</i>	0,17±0,01	0,90±0,04**
Фила <i>Firmicutes</i>	35,46±1,69	65,38±2,95**
класс <i>Clostridia</i>	5,35±0,21	10,96±0,43**
семейство <i>Lachnospiraceae</i>	1,48±0,06	0,69±0,03**
семейство <i>Eubacteriaceae</i>	1,07±0,04	8,18±0,03***
семейство <i>Ruminococcaceae</i>	0,84±0,03	0,47±0,02**
семейство <i>Clostridiaceae</i>	1,89±0,09	1,62±0,07
род <i>Peptostreptococcus</i>	0,07±0,01	Н.п.д.о.
род <i>Lactobacillus</i>	7,83±0,33	23,07±1,13**
род <i>Bacillus</i>	2,93±0,13	9,65±0,61**
род <i>Staphylococcus</i>	0,25±0,01	Н.п.д.о.
порядок <i>Negativicutes</i>	19,10±0,97	21,70±1,03
Фила <i>Actinobacteria</i>	0,16±0,01	Н.п.д.о.
Фила <i>Proteobacteria</i>	2,04±0,03	2,64±0,06**
семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	0,87±0,23	1,95±0,15*
семейство <i>Campylobacteriaceae</i>	0,21±0,01	Н.п.д.о.
семейство <i>Pseudomonadaceae</i>	0,96±0,04	0,21±0,01***
род <i>Acinetobacter</i>	Н.п.д.о.	0,48±0,02
семейство <i>Pasteurellaceae</i>	2,60±0,14	1,84±0,08*
Фила <i>Fusobacteria</i>	0,07±0,01	0,14±0,01*
Неклассифицированные последовательности	59,49±2,98	29,10±1,39**

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика». Н.п.д.о. — ниже предела достоверного определения методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). * ** *** — различия с контролем статистически значимы соответственно при $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,001$.

Идентифицированные бактерии принадлежали к пяти филумам, из которых преобладали представители филума *Firmicutes*, в том числе из класса *Clostridia* и порядка *Negativicutes*. Традиционно бактерии семейств *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Eubacteriaceae*, относящиеся к классу *Clostridia*, считают основными источниками ферментов (целлюлаз, гемицеллюлаз, амилаз и др.), необходимых для метаболизма углеводов растительных кормов. Как правило, образующиеся при этом ЛЖК используются представителями порядка *Negativicutes*, включая бактерии родов *Megasphaera*, *Selenomonas* и др. Отметим, что указанные процессы ранее описаны преимущественно для жвачных (25). Менее были представлены филумы *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria*.

Среди микроорганизмов, выявленных в содержимом толстого отдела кишечника поросят, часть относится к условно-патогенным и патоген-

ным. Бактерии рода *Fusobacterium*, обнаруженные у поросят обеих групп, традиционно считались возбудителями некробактериоза скота (26), в настоящее время с использованием молекулярно-генетических методов подтверждено их присутствие в кишечнике, различных органах, на кожных покровах у животных и человека (27). Представители семейств *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteriaceae*, выявленные в кишечнике в незначительных количествах, относятся к типичным возбудителям дисбиотических процессов у животных. Вызывает интерес то обстоятельство, что в кишечнике поросят были обнаружены бактерии из семейства *Pasteurellaceae* — возбудители заболеваний респираторного тракта у животных и птицы (16). В то же время бактерии рода *Staphylococcus*, традиционно присутствующие в содержимом кишечника животных, у поросят практически отсутствовали.

Часть микроорганизмов при таксономическом анализе бактериального сообщества идентифицировать не удалось, что согласуется с данными зарубежных и отечественных исследований микробиома пищеварительного тракта разных видов животных и птицы (23, 28). Что касается идентифицированных бактерий, то результаты, полученные с применением метода T-RFLP, тоже не противоречили известным представлениям (16, 21, 25) за некоторыми исключениями. Так, бактерии рода *Lactobacillus*, которые считаются доминирующими обитателями кишечника свиней, в исследованных нами пробах обнаруживались в небольших количествах. Кроме того, в кишечнике этих поросят полностью отсутствовали энтерококки и бифидобактерии, описанные ранее как представители автохтонной микробиоты толстого отдела кишечника у животных и птицы (16, 21).

Выпаивание один раз в неделю препарата на основе штамма *L. plantarum* L-211, продуцирующего в минимальной питательной среде в среднем $148,4 \pm 4,45$ мг/л лизина (8, 9), в количестве не менее 10^9 КОЕ/гол. качественно и количественно изменяло микробиоту толстого отдела кишечника поросят. Достоверно 3-кратно увеличивалась доля представителей рода *Lactobacillus* ($P < 0,01$), что, вероятно, связано с хорошей приживаемостью и размножением интродуцированных лактобацилл в содержимом кишечника. Известна способность ряда лактобактерий к адгезии на стенках кишечника, что позволяет им колонизировать пищеварительный тракт (29) и занимать свободные экологические ниши в его микробиоме, оказывая пробиотический эффект. Кроме того, при выпаивании штамма *L. plantarum* L-211 более чем 3-кратно возросло число представителей рода *Bacillus* ($P < 0,01$), которые тоже способны (благодаря синтезу органических кислот и бактериоцинов) к конкурентному вытеснению патогенов (16). Добавление препарата *L. plantarum* L-211 к рациону поросят также сказалось на размножении бактерий из фило *Bacteroidetes* и класса *Clostridia*, продуцирующих целлюлозо- и амилитические ферменты, вызвав соответственно 5- ($P < 0,01$) и 2-кратное ($P < 0,01$) увеличение их числа в толстом кишечнике по сравнению с контролем. Доля бактерий из порядка *Negativicutes*, утилизирующих кислоты, под влиянием пробиотических лактобактерий существенно не менялась.

Важное значение имел положительный эффект от применения пробиотического препарата на основе *L. plantarum* L-211 в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, доля которых в кишечнике поросят из опытной группы уменьшалась. При этом представленность рода *Staphylococcus* и семейства *Campylobacteriaceae* снижалась до количеств, не детектируемых методом T-RFLP, а семейства *Pasteurellaceae* — в 1,41 раза ($P < 0,05$). Также достоверно сокращалась численности бактерий семейства *Pseudomonadaceae* (в 4,57 раза, $P < 0,001$) — транзитных микроорганизмов, поступающих в кишечник с кормом. Доля неидентифицированных бактерий до-

стоверно снижалась в опыте относительно контроля (в 2,05 раза, $P < 0,01$).

2. Зоотехнические показатели у 84-суточных поросят породы крупная белая при выпайвании препарата на основе штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 (ООО «Новгородский бекон», Новгородская обл.)

Показатель	I группа (контроль, $n = 715$)	II группа (опыт, $n = 657$)
Общая масса, кг	8567	6753
Падёж:		
по числу, гол.	13	8
по массе, кг	203	116
Санитарный забой:		
по числу, гол.	9	11
по массе, кг	181	299
Передано на откорм:		
по числу, гол.	693	638
по массе, кг	21550	19875
Масса ($\bar{X} \pm x$), кг/гол.	$31,10 \pm 1,48$	$31,15 \pm 1,39$
Сохранность, %	98,18	98,78
Валовый прирост, кг	13367	13537
Возраст при передаче, сут	83	84
Кормодней, всего	28675	27288
Среднесуточный прирост массы ($\bar{X} \pm x$), г	$466,20 \pm 11,29$	$496,10 \pm 10,14^*$
Расход комбикорма, кг:		
всего	26700	26400
комбикорм СК-4	17890	18300
комбикорм СК-5	8810	8100
Конверсия корма ($\bar{X} \pm x$), кг	$1,997 \pm 0,040$	$1,950 \pm 0,050$
Расход комбикормов на кормодень, кг	0,931	0,967
Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».		
* Различия с контролем статистически значимы при $P < 0,05$.		

Анализ зоотехнических показателей (табл. 2) подтвердил повышение сохранности, среднесуточного прироста массы ($P < 0,05$) и эффективности конверсии корма при использовании препарата *L. plantarum* L-211.

Итак, препарат на основе штамма *Lactobacillus plantarum* L-211, синтезирующего лизин, обладает высокой пробиотической активностью, оказывая положительное воздействие на состав бактериального сообщества толстого кишечника поросят. При скармливании препарата доля представителей нормофлоры (роды *Lactobacillus* и *Bacillus*) достоверно увеличивалась, ряда микроорганизмов, традиционно связанных с дисбиозом кишечника у человека и животных (семейства *Campylobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, род *Staphylococcus*) — уменьшалась. Изменение структуры микробного сообщества положительно отразилось на зоотехнических показателях: повысилась сохранность поросят, среднесуточный прирост массы ($P < 0,05$), улучшилась конверсия корма. Следовательно, этот пробиотик в период доращивания может способствовать получению высокопродуктивного поголовья и снижению затрат комбикормов на единицу продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиевский В.И. Физиология сельскохозяйственных животных. М., 1990.
2. Эрнст Л.К., Лаптев Г.Ю. Оптимизация микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных. СПб, 2011.
3. Hulshof T.G., van der Poel A.F., Hendriks W.H., Bikker P. Amino acid utilization and body composition of growing pigs fed processed soybean meal or rapeseed meal with or without amino acid supplementation. *Animal*, 2016, 5: 1-11 (doi: 10.1017/S1751731116002548).
4. Gallo L., Dalla Bona M., Carraro L., Cecchinato A., Carnier P., Schiavon S. Effect of progressive reduction in crude protein and lysine of heavy pigs diets on some technological properties of green hams destined for PDO dry-cured ham production. *Meat Sci.*, 2016, 121: 135-140 (doi: 10.1016/j.meatsci.2016.06.005).
5. Craig A., Henry W., Magowan E. Effect of phase feeding and valine-to-lysine ratio during lactation on sow and piglet performance. *J. Anim. Sci.*, 2016, 94(9): 3835-3843 (doi: 10.2527/jas.2016-0648).
6. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие /Под ред. А.П. Калашникова, В.И. Фисниной, В.В. Шеллова, Н.И. Клейменова. М., 2003.
7. Hulshof T.G., Poel A.F., Hendriks W.H., Bikker P. Amino acid utilization and body composition of growing pigs fed processed soybean meal or rapeseed meal with or without amino acid supplementation. *Animal*, 2016, Dec 5: 1-11 (doi: 10.1017/S1751731116002548).
8. Фиснин В.И., Чеботарев И.И., Никонов И.Н., Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю., Машенцева Н.Г. Подходы к созданию пробиотических биопрепаратов на основе лизин-продуцирующих бактерий. *Биофармацевтический журнал*, 2014, 6(6): 60-64.
9. Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Филиппова В.А., Никонов И.Н., Лап-

- тев Г.Ю., Новикова Н.И., Фисинин В.И., Чеботарев И.И., Машенцева Н.Г., Клубукова Д.Л. Определение пробиотической активности штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 методом T-RFLP. Биофармацевтический журнал, 2015, 7(6): 11-15.
10. Lal P.B., Schneider B.L., Vu K., Reitzer L. The redundant aminotransferases in lysine and arginine synthesis and the extent of aminotransferase redundancy in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 2014, 94(4): 843-856 (doi: 10.1111/mmi.12801).
 11. Zhou L.B., Zeng A.P. Exploring lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. ACS Synth. Biol., 2015, 4(6): 729-734 (doi: 10.1021/sb500332c).
 12. Xing Y., Wang S., Fan J., Oso A.O., Kim S.W., Xiao D., Yang T., Liu G., Jiang G., Li Z., Li L., Zhang B. Effects of dietary supplementation with lysine-yielding *Bacillus subtilis* on gut morphology, cecal microflora, and intestinal immune response of Linwu ducks. J. Anim. Sci., 2015, 93(7): 3449-3457 (doi: 10.2527/jas.2014-8090).
 13. Odunfa S.A., Adeniran S.A., Teniola O.D., Nordstrom J. Evaluation of lysine and methionine production in some *Lactobacilli* and yeasts from Ogi. Int. J. Food Microbiol., 2001, 63(1-2): 159-163.
 14. Delia E., Tafaj M., Mannerin K. Efficiency of probiotics in farm animals. In: Probiotic in animals /E. Rigobelo (ed.). InTech., 2012. V. 2: 247-272 (doi: 10.5772/50055).
 15. Li P., Li X., Gu Q., Lou X.Y., Zhang X.M., Song D.F., Zhang C. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 reveals its genetic adaptation and potential probiotic properties. J. Zhejiang Univ. Sci. B, 2016, 17(8): 569-579 (doi: 10.1631/jzus.B1600176).
 16. Seo B.J., Mun M.R., Rejish Kumar V.J., Kim C.-J., Lee I., Chang Y.-H., Park Y.H. Bile tolerant *Lactobacillus reuteri* isolated from pig feces inhibits enteric bacterial pathogens and porcine rotavirus. Vet. Res. Commun., 2010, 34(4): 323-333 (doi: 10.1007/s11259-010-9357-6).
 17. Pajarillo E.A., Chae J.P., Balolong M.P., Kim H.B., Seo K.S., Kang D.-K. Characterization of the fecal microbial communities of Duroc pigs using 16S rRNA gene pyrosequencing. Asian-Australas. J. Anim. Sci., 2015, 28: 584-591 (doi: 10.5713/ajas.14.0651).
 18. Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: A review. Veterinarni Medicina, 2010, 55(5): 199-224.
 19. Dicksved J., Floistrup H., Bergstrom A., Rosenquist M., Pershagen G., Scheynius A., Roos S., Alm J.S., Engstrand L., Braun-Fahrlander C., von Mutius E., Jansson J.K. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73: 2284-2289 (doi: 10.1128/AEM.02223-06).
 20. Davis E., Rehberger J., King M., Brown D.C., Maxwell C.V., Rehberger T. Characterization of gastrointestinal microbial and immune populations post-weaning in conventionally-reared and segregated early weaned pigs (Proc. 11th Int. Symp. on Digestive Physiology of Pigs, Costa Daurada, 2009). Livestock Sci., 2010, 133: 92-94 (doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.032).
 21. Chae J.P., Pajarillo E.A., Oh J.K., Kim H., Kang D.K. Revealing the combined effects of lactulose and probiotic enterococci on the swine faecal microbiota using 454 pyrosequencing. Microbial Biotechnology, 2016, 9: 486-495 (doi: 10.1111/1751-7915.12370).
 22. Dicksved J., Jansson J.K., Lindberg J.E. Fecal microbiome of growing pigs fed a cereal based diet including chicory (*Cichorium intybus* L.) or ribwort (*Plantago lanceolata* L.) forage. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2015, 6: 53 (doi: 10.1186/s40104-015-0054-8).
 23. Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Ильина Л.А., Ёылдырым Е.А., Нагорнова К.В., Думова В.А., Солдатова В.В., Большаков В.Н., Горфункель Е.П., Дубровина Е.Г., Соколова О.Н., Никонов И.Н., Лебедев А.А. Нормы содержания микрофлоры в рубце крупного рогатого скота. СПб, 2014.
 24. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
 25. Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. М., 2006.
 26. Niscek J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. J. Dairy Sci., 1997, 80: 1005-1028 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0).
 27. Encyclopedia of metagenomics: environmental metagenomics /S.K. Highlander, F. Rodriguez-Valera, B.A. White (eds.). Springer US, NY, 2015.
 28. Kraler M., Ghanbari M., Domig K.J., Schedle K., Kneifel W. The intestinal microbiota of piglets fed with wheat bran variants as characterised by 16S rRNA next-generation amplicon sequencing. Arch. Anim. Nutr., 2016, 70(3): 173-189 (doi: 10.1080/1745039X.2016.1160534).
 29. Kusan M., Gobin I., Markov K., Jurcic Momcilovic D., Frece J. Testing the adhesion and colonization ability of *Lactobacillus plantarum* strain S1 to the mice intestinal epithelium. International Journal of Sanitary Engineering Research, 2012, 6(1): 25-30.

e-mail: olga@vnitip.ru;

²ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства

им. академика Л.К. Эрнста,

142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,

e-mail: vijinfo@yandex.ru;

³ООО «Биореактор»,

114142 Россия, Московская обл., г. Шелково, ул. Комарова, 18;

⁴ООО «Биотроф»,

192288 Россия, г. Санкт-Петербург, а/я 183,

e-mail: nikonov@biotrof.ru

⁵ФГБОУ ВО Московский государственный университет

пищевых производств,

125080 Россия, г. Москва, Волоколамское ш., 11

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 418-424

DIETARY PROBIOTIC *Lactobacillus plantarum* L-211 FOR FARM ANIMALS. II. THE ADDITIVE FOR PIGLETS

V.I. Fisinin¹, E.A. Artem'eva², I.I. Chebotarev³, G.Yu. Laptev⁴, I.N. Nikonov⁴,
L.A. Il'ina⁴, N.G. Mashentseva⁵, A.V. Savinov³, D.L. Klabukova⁵, E.A. Yildirim⁴,
N.I. Novikova⁴

¹Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141315 Russia, e-mail olga@vnitip.ru;

²L.K. Ernst All-Russian Research Institute of Animal Husbandry, Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail vijinfo@yandex.ru;

²JSC «Bioreactor», 18, ul. Komarova, Shchelkovo, Moscow Province, 114142 Russia;

⁴JSC «Biotrof», Kolpino, St. Petersburg, 192288 Russia, e-mail nikonov@biotrof.ru (corresponding author);

⁵Moscow State University of Food Production, 11, Volokolamskoe sh., Moscow, 125080 Russia

ORCID: Fisinin V.I. orcid.org/0000-0003-0081-6336

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially under the subsidy agreement with Ministry of Education and Science of the Russian Federation № 14.579.21.0021 dated 05.06.2014

Received October 3, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2017.2.418eng

Abstract

The lack of lysine in the diet of pigs negatively affects appetite, weight gain, metabolism and immunity of animals. Most feeds for pigs are deficient in lysine. Synthetic amino acids, as feed additives, make feeds significantly more expensive. In this regards, the biologics based on microbial producers able to synthesize lysine in the gastrointestinal tract of animals are promising. However, common producers of lysine, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli* and the genus *Corynebacterium*, are conditionally pathogenic as a causal agents of opportunistic infections. In the present study, we first examined the changes in intestinal bacterial community and the productive performance in Large White pigs («Novgorod bacon», Novgorod Province) under the influence a lysine producing strain *Lactobacillus plantarum* L-211 (JSC «Bioreactor», Moscow). Taxonomic composition of microorganisms was determined by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) analysis. For surveillance we used two groups of pigs from 28- to 84-day age, fed with the basic diet ($n = 715$, group 1, control) and the same diet supplemented with *L. plantarum* L-211 at the dose not less than 10^9 CFU per animal added to water ($n = 657$, group 2). Microbial community in the pigs' large intestine was taxonomically divers and included a number of unidentified phylotypes. Here, the predominating bacteria were representatives of the phylum *Firmicutes*, including mainly *Clostridia* possessing cellulolytic and amylolytic properties, as well as the members of order Negativicutes able to ferment acids. The phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Fusobacteria* were less abundant. The counts of genus *Lactobacillus* was lower than previously assumed, moreover, there was a complete absence of enterococci and bifidobacteria, which are usually attributed to the autochthonous microbiota of the large intestine of animals and birds. Lysine synthesizing strain *L. plantarum* L-211 had a high probiotic effect resulting in a significant increase in the counts of genera *Lactobacillus* (2.94-fold, $P < 0.01$) and *Bacillus* (3.29-fold, $P < 0.01$), of phylum *Bacteroidetes* (5.29-fold, $P < 0.01$), and class *Clostridia* (2.05-fold, $P < 0.01$), whereas the proportions of pathogens from *Staphylococcus* genus and *Campylobacteriaceae* family were below the T-RFLP sensitivity, and the family *Pasteurellaceae* decreased in number 1.41-fold ($P < 0.05$). Both the survival and the average daily weight gain ($P < 0.05$) in pigs, as influenced by the probiotic strain *L. plantarum* L-211, were higher. *L. plantarum* L-211 also improved feed conversion efficiency as compared to the control pigs.

Keywords: lysine, intestinal microflora, pigs, bacterial community, T-RFLP, probiotic, *Lactobacillus plantarum*, productivity, pigs' survival, feed conversion.