

Микробиология, вирусология, молекулярная биология

УДК 636.52/.58:615.33:619:579.62:577.2

doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.46rus

**СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА
У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОБИОТИКА И
АНТИБИОТИКА (ПО ДАННЫМ T-RFLP—RT-PCR)***

А.А. ГРОЗИНА

Кишечник птиц представляет собой не только первую линию защиты от экзогенных патогенов, но и самый большой орган, участвующий в обеспечении иммунитета. Микрофлора, обитающая в слепых отростках кишечника, выполняет многочисленные функции по поддержанию гомеостаза макроорганизма, в том числе играя важную роль в процессах переваривания кормов. Препараты пробиотиков, антибиотиков, пребиотиков, симбиотиков, ферментов и т.п. способны прямо или косвенно влиять на микрофлору кишечника птицы и, следовательно, увеличивают суточный прирост живой массы цыплят, сохранность, убойный выход, улучшают переваримость питательных веществ корма, качество и санитарную безопасность тушек. Однако влияние этих препаратов на микрофлору кишечника цыплят до конца не изучено. Появление и развитие современных молекулярно-генетических методов позволило изучать разнообразие микроорганизмов без ограничений, сопутствующих традиционным техникам. Мы изучили состав и возрастную динамику микрофлоры в желудочно-кишечном тракте у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 методами T-RFLP с RT-PCR при использовании добавок к полнорационному комбикорму, которыми служили пробиотик целлюлозацетат-Т и антибиотик стафак-110. Проведенный анализ показал, что введение в рацион птицы антибиотика и пробиотика способствовало увеличению общего числа бактерий, причем численность представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (целлюлозолитические бактерии, лактобактерии, бифидобактерии, бациллы, селеномонады) возрастала, а доля нежелательных энтеробактерий, актиномицетов снижалась. У бройлеров из группы, получавшей пробиотик, по сравнению с птицей, в рацион которой добавляли антибиотик, в исследуемых отделах кишечника было больше целлюлозолитических бактерий, в слепых отростках — в 10-100 раз больше лактобактерий, бифидобактерий, бацилл, а также меньше клостридий и транзитных бактерий. Многочисленные исследования пробиотических препаратов уже подтвердили их эффективность в птицеводстве, что отражено в зоотехнических показателях, однако только с использованием современных молекулярных методов идентификации микрофлоры желудочно-кишечного тракта (в частности, T-RFLP-анализ с RT-PCR) можно определить, на представителей каких таксономических групп микроорганизмов влияет тот или иной препарат, для дополнительного обоснования рациональности его использования.

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, желудочно-кишечный тракт, 12-перстная кишка, слепой отросток, микрофлора, нормальная микрофлора, патогенная микрофлора, T-RFLP, RT-PCR.

Высокие темпы мирового производства мяса птицы во многом связаны с последними достижениями в области генетики, селекции, кормления, технологий содержания и ветеринарной защиты (1). Так, современные промышленные кроссы обладают огромным генетическим потенциалом для роста и эффективной конверсии корма, что позволяет к 38-суточному возрасту птицы получать около 2,2-2,3 кг живой массы при затратах корма на единицу прироста 1,45-1,50 кг/кг (2). У таких цыплят в 1-ю нед жизни живая масса повышается минимум в 3-4 раза, при этом желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) развивается еще быстрее. Подобные изменения часто отрицательно связаны со здоровьем птицы (как правило, чем выше продуктивность особи, тем она чувствительнее к различным стрессам), что значительно усложняет селекционное решение проблемы (3).

Многочисленные исследования позволили установить роль нормальной микрофлоры организма, которая принимает участие в функциях

* Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда по научному проекту «Современные представления о микрофлоре кишечника птицы при различных рационах питания: молекулярно-генетические подходы» № 14-16-00140.

сердечно-сосудистой, эндокринной, кроветворной, нервной и других систем, участвует в формировании иммунологической реактивности, выработке антибиотических соединений, белков, ферментов, гормонов, витаминов и ряда других соединений, а также предохраняет внутренние органы от внедрения и неограниченного размножения в них патогенных микроорганизмов (4-6). Через воздействие на переваримость компонентов корма и развитие систем пищеварительного тракта микрофлора существенно влияет на усвоение питательных веществ, пищевые потребности, физическое состояние и скорость роста птицы (7).

Для цыплят несколько суток накануне и после вывода считаются критическими для развития и выживания. В течение указанного периода в их организме происходит метаболический и физиологический переход от питания в яйце за счет желтка к сухому корму. При этом кишечник быстро развивается для того, чтобы эффективно использовать питательные вещества корма. Замедленное формирование кишечной микрофлоры в первые дни жизни ставит существование молодняка птицы в зависимость от санитарного состояния кормов, воды и условий содержания (8).

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнения и тот факт, что кишечник представляет собой не только первую линию защиты от экзогенных патогенов, способных колонизировать клетки и ткани хозяина, но и самый большой орган, участвующий в обеспечении иммунитета. Любые изменения в морфологии кишечника могут привести к подавлению всасывания питательных веществ, повышению секреции, развитию диареи, снижению устойчивости к болезням и продуктивности в целом (9). По сравнению с другими отделами пищеварительной системы птицы в слепых отростках кишечника численность микроорганизмов наибольшая (10^{10} - 10^{11} на 1 г содержимого) (10). Микрофлора, обитающая в слепых отростках кишечника, выполняет многочисленные функции по поддержанию гомеостаза макроорганизма, в том числе играя важную роль в процессах переваривания кормов

Известно, что одной из важнейших функций нормальной микрофлоры является колонизационная резистентность, которая определяет ее защитные свойства. При воздействии отрицательных факторов нарушается стабильность соотношения индигенной флоры, а также адгезивность и колонизационная резистентность, что приводит к развитию патологических процессов, именуемых дисбиозами (дисбактериозами) (11). В результате таких изменений кишечник заселяется видами микроорганизмов, которые ранее не встречались в нормальной микрофлоре макроорганизма, а также начинают превалировать штаммы бактерий, которые, хотя и относятся к естественной микрофлоре, но обладают свойствами, отличающими их от облигатных бактерий тех же видов. Например, при дисбактериозах более 50 % *Escherichia coli* проявляют гемолитической активностью, приобретают способность образовывать гиалуронидазу, что служит признаком повышения вирулентности. Кроме того, отличительная особенность форм, выделяемых при дисбактериозах, — их множественная лекарственная устойчивость. Также в кишечнике уменьшается число лакто- и бифидобактерий, которые выполняют ряд важных функций: защищают слизистую кишечника от проникновения в кровь патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, синтезируют антибиотикоподобные вещества, органические кислоты, участвуют в синтезе витаминов группы В, стимулируют иммунную защиту организма (12-14).

Как известно, рационы для высокопродуктивной птицы составляются так, чтобы обеспечить максимально быстрый рост за небольшой

промежуток времени. В то же время повышенное содержание питательных веществ в корме часто приводит к нарушению баланса микроорганизмов в кишечнике (15). В стремлении бороться с патогенными микроорганизмами используются кормовые антибиотики, подкислители и другие химикаты, хотя далеко не все микроорганизмы с ними совместимы. Многие бактерии, например, не выдерживают экспандирования и гранулирования комбикормов (16).

В последние годы биологическая промышленность выпускает множество препаратов, которые способны прямо или косвенно влиять на микрофлору кишечника птицы и, следовательно, увеличивают суточный прирост живой массы цыплят, сохранность, убойный выход, улучшают переваримость питательных веществ корма, качество и санитарную безопасность тушек. Это пробиотики, антибиотики, пребиотики, симбиотики, ферменты и т.п. (17). Однако парадокс заключается в том, что влияние этих препаратов на микрофлору кишечника цыплят до конца не изучено.

Антибиотики добавляли в корма для животных, чтобы поддержать здоровье и экономическую эффективность производства, но из-за развития резистентности у патогенных бактерий, от которой может зависеть и здоровье людей, в странах Европы антибиотики в настоящее время исключены из рациона птицы и свиней (в Швеции — с 1986 года, в странах Евросоюза — с 2006 года) (18). Из-за бессистемного применения антибиотиков снижается численность полезной кишечной микрофлоры, более того, с периодичностью примерно 2-3 года появляются устойчивые штаммы, которые ранее не выделяли. На разработку нового антибиотика необходимо затратить существенно больше времени, а результаты не всегда соответствуют ожиданиям, так как в ряде случаев эти препараты влияют на моторную функцию ЖКТ (19). Как следствие, в последние годы возрастает актуальность поиска альтернатив для замены кормовых антибиотиков.

Пробиотические микроорганизмы стали активно применяться в странах Евросоюза с 2006 года в связи с запретом на кормовые антибиотики и некоторые антибактериальные препараты. Пробиотические препараты обычно содержат живую микробную культуру, которая может быть представителем нормальной микрофлоры ЖКТ животного: лакто- и бифидобактерии, спорообразующие микроорганизмы, дрожжи и некоторые грибы (20). Пробиотики используют для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ инфекционной природы, стимуляции неспецифического иммунитета, коррекции дисбактериозов пищеварительного тракта, возникающих вследствие резкого изменения состава комбикормов, при нарушениях режимов кормления и стрессах птицы во время пересадок, для замены антибиотиков в комбикормах для птицы (21).

В связи с огромным числом предложений по комбикормам и кормовым добавкам для птицеводства возникает необходимость их рационального выбора. Этот вопрос можно решить только с помощью точного, быстрого и низкоч затратного мониторинга микроорганизмов в ЖКТ (22).

Большинство сведений о составе и роли микрофлоры ЖКТ у сельскохозяйственной птицы были получены с помощью классических методов микробиологии. Однако эти подходы имеют ряд существенных ограничений и недостатков. Например, не удается правильно подсчитать микроорганизмы при расसेве на питательные среды, если колония образовалась не из одной клетки, а из их скопления (23). Кроме того, зарубежными исследователями установлено, что значительная часть микроорганизмов ЖКТ представлена некультивируемыми видами, то есть формами, неспособными расти на существующих питательных средах (24). Отметим,

что проблему некультивируемых микроорганизмов следует отнести к глобальным, поскольку она признана актуальной для многих областей микробиологии — в почвоведении, растениеводстве, медицине, ветеринарии и др. Существование бактерий в отсутствие клеточной стенки — весьма своеобразное и широко распространенное явление, к которому неприменимы принципы классической микробиологии. L-трансформация бактерий с образованием L-форм затрудняет обнаружение патогенов и служит причиной многочисленных ложноотрицательных заключений по результатам биопроб, так как L-формы находятся в некультивируемом состоянии (25).

Появление и развитие современных молекулярно-генетических методов позволило изучать разнообразие микроорганизмов без ограничений, сопутствующих традиционным техникам, то есть минуя стадию культивирования. К наиболее перспективным приемам в настоящее время относят применение полимеразной цепной реакции, и в частности T-RFLP-анализ (terminal restriction fragment length polymorphism) — молекулярно-генетический метод, основанный на оценке полиморфизма длин амплифицированных рестрикционных фрагментов ДНК микроорганизмов (26). Он предназначен для определения общей и относительной численности, а также таксономической принадлежности всех бактерий в микробной экосистеме, что дает возможность осуществлять широкомасштабное и детальное сравнительное изучение микробных сообществ в их развитии и изменении (27).

В России этот метод начал использоваться относительно недавно. В частности, компанией ООО «Биотроф» (г. Санкт-Петербург) в 2008 году методика T-RFLP-анализа была модифицирована для изучения микрофлоры ЖКТ у сельскохозяйственной птицы (28). Предложенный регламент позволяет за короткий срок максимально точно определять состав микрофлоры пищеварительного тракта, на ранних стадиях выявлять патогенные формы, а также оценивать эффект кормовых добавок в отношении микрофлоры кишечника.

Наша цель заключалась в изучении состава и возрастной динамики микрофлоры в желудочно-кишечном тракте цыплят-бройлеров методами T-RFLP с RT-PCR при использовании в качестве кормовых добавок пробиотика и антибиотика.

Методика. Научно-практический опыт выполняли на цыплятах-бройлерах кросса Cobb 500 (виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», г. Сергиев Посад, 2013 год). Цыплят выращивали в клеточных батареях типа Р-15 с 1- до 35-суточного возраста. Опытные и контрольные группы комплектовали аналогами по живой массе в 1-суточном возрасте (по 70 гол. в группе и по 35 гол. в клетке). Для кормления птицы во всех группах использовали полнорационные комбикорма в виде россыпи с питательностью согласно следующим возрастным рекомендациям по работе с используемым кроссом от фирмы-оригинатора:

	0-5 сут	6-15 сут	15-36 сут
Пшеница, %	60,40	59,96	67,11
Шрот соевый, %	23,03	19,43	11,05
Шрот подсолнечный, %	6,00	7,20	7,31
Мука рыбная, %	4,00	2,50	0
Мука мясокостная, %	0	2,00	5,00
Масло соевое, %	3,11	5,33	6,00
Известняк, %	0,87	1,01	0,19
Монокальцийфосфат, %	1,00	0,70	0
Трикальцийфосфат, %	0	0,37	1,84
Витаминно-минеральный премикс, %	1,50	1,50	1,50

В I группе (контроль) птица получала сбалансированный по нормам для кросса рацион с содержанием белка животного происхождения 4,0 % (в возрасте 0-5 сут), 4,5 % (в возрасте 6-15 сут) и 5,0 % (с 15-х сут)

(ОР). К ОР на протяжении всего периода выращивания птицы во II опытной группе добавляли антибиотик стафак-110 («Phibro Animal Health Corporation», США) в дозировке 180 г/т корма, в III опытной группе — пробиотик целлобактерин-Т (ООО «Биотроф», Россия) в дозировке 1 кг/т корма, используя прямое смешивание.

Для отбора проб проводили убой цыплят-аналогов по живой массе (произвольно по 6 гол. из каждой группы) в возрасте 1; 7; 14; 21 и 35 сут. При этом с целью получения более полного представления о микробном фоне брали особей с заполненным зобом, а 1-суточных цыплят — через 1 сут после кормления. Отбор содержимого 12-перстной кишки и слепых отделов кишечника в одноразовые пробирки типа эппендорф выполняли с соблюдением условий асептики. До транспортировки в лабораторию пробы помещали в морозильную камеру (–20 °С), перевозку материала осуществляли в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами (–18 °С).

T-RFLP- и RT-PCR выполняли согласно методике, разработанной австралийскими учеными (29) и опубликованной в российских источниках (30). Совместно с ООО «Биотроф» метод был апробирован (31).

ДНК для T-RFLP-анализа выделяли при помощи набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas», Литва). Для лизиса клеточных стенок в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл к навеске 200 мкг добавляли 400 мкл лизирующего раствора, перемешивали в вортексе (CVP-2, «BioSan», Латвия) и инкубировали в термошейкере (TS-100, «Biosan», Латвия) при 65 °С в течение 30 мин. Для преципитации ДНК в микроцентрифужные пробирки добавляли 800 мкл специального раствора, после чего смесь помещали в мультивортекс (V-32, «BioSan», Латвия), а затем центрифугировали в настольной центрифуге («Beckman Coulter», США) (14000 оборотов/мин, 10 мин). Отделяли осадок, тщательно перемешивали в вортексе со 100 мкл раствора NaCl и 300 мкл 96 % этилового спирта и центрифугировали в том же режиме, после чего осадок помещали в термостат Гном (Россия) при 45 °С до полного высушивания. К осадку добавляли 100 мкл стерильной дистиллированной воды и перемешивали смесь в вортексе. Полученный раствор ДНК хранили в морозильной камере при –20 °С до дальнейших исследований. Качество препарата ДНК оценивали с использованием электрофореза в 1 % агарозном геле в камере («Bio-Rad», США) с TAE-буфером («Fermentas», США); маркер молекулярных масс — Gene Ruler («Fermentas», США) по 3 мкл (режим разделения — 50 В, 1 ч). Гели просматривали и результаты документировали с помощью трансиллюминатора («New England BioGroup», США).

При T-RFLP-PCR-амплификации использовали следующие реагенты («Fermentas», США): праймеры — 10 пМ; Taq-полимераза — 10 ед., ×10 буфер для Taq-полимеразы; MgCl₂ — 2,5 мМ; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов — 2,5 мМ; ДНК-матрица — 10 нг. Для амплификации гена 16S-rРНК бактерий подбирали специфичные варианты олигонуклеотидов (63f, 1087r) с флуоресцентной меткой 5'-конца. Дополнительно к опытным пробам использовали негативный (смесь без ДНК) и позитивный (успешно амплифицированная ДНК) контроли. Реакцию проводили в программируемом амплификаторе iCycler («Bio-Rad», США) в следующем режиме: денатурация — 95 °С, 3 мин; 34 цикла (денатурация; отжиг; элонгация) — 95 °С, 30 с; 42–60 °С, 30–60 с; 72 °С, 1 мин; элонгация — 72 °С, 10 мин. Качество образцов оценивали с использованием электрофореза («Bio-Rad», США), как было описано выше, с учетом размера фрагментов и чистоты ДНК.

Очистку ДНК-фрагментов из блоков агарозного геля проводили с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas», Лит-

ва) согласно прилагаемым инструкциям. Преципитат ДНК растворяли в 15 мкл деионизированной воды и использовали для рестрикции с применением набора реагентов («Fermentas», США: 1,5 мкл буфера для рестрикции; 10 ед. рестриктазы (HaeIII, HhaI и MspI); деионизированная вода — до 15 мкл). Реакцию останавливали прогреванием при 72 °С 20 мин.

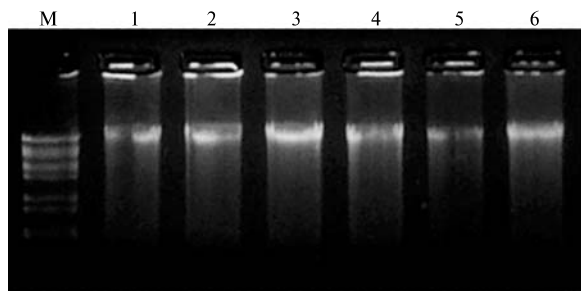


Рис. 1. Пример электрофореграммы препаратов ДНК, используемых для анализа состава микрофлоры кишечника птицы в T-RFLP—RT-PCR: М — маркер молекулярных масс Gene Ruler («Fermentas», США), 1-6 — исследуемые пробы ДНК (1 % агарозный гель, TAE-буфер, 50 В, 1 ч).

флуоресценции проб (10-200 тыс. ед.) и длине контрольных фрагментов (600 п.н.), после чего в MS Excel получали матрицу данных и определяли филогенетическую принадлежность микроорганизмов с помощью программы FragSort (<http://mica.ibest.uidaho.edu>). Точную таксономическую принадлежность флотипов определяли на основе обработки проб для всех трех эндонуклеаз (HaeIII, HhaI и MspI) с вычислением их процентной доли в микробном сообществе.

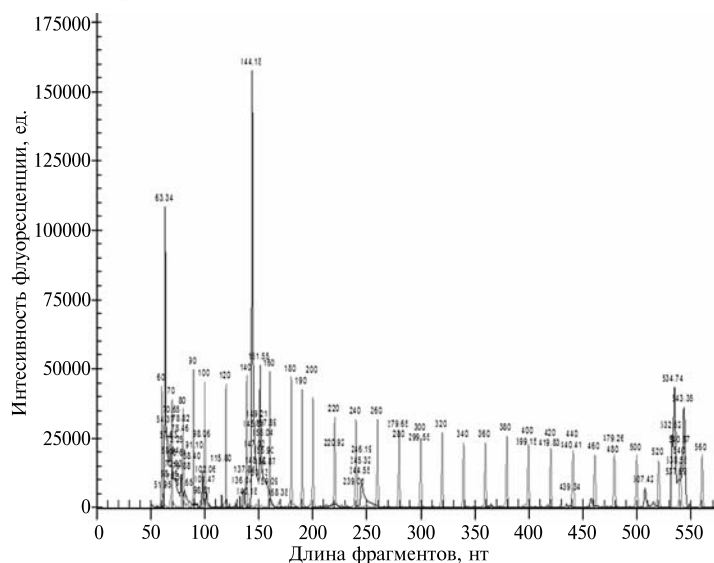


Рис. 2. Пример паттерна, отражающего результаты электрофореза фрагментов при анализе состава микробного сообщества в кишечнике птицы методом T-RFLP-PCR (серым цветом отмечены маркерные пики, черным — профиль фрагментов в образце).

время программа амплификатора строила калибровочный график, согласно которому вычислялось количество геномов в опытных пробах. Математическую обработку результатов выполняли в программе MS Excel.

Результаты. Оценка качества образцов ДНК с использованием

Для капиллярного электрофореза полученных фрагментов к пробам после стандартной подготовки добавляли по 0,2 мкл маркера (набор для определения размера фрагментов ДНК Size Standart 600, «Beckman Coulter», США). Образцы анализировали, используя автоматический секвенатор SEQ8000 («Beckman Coulter», США) с программой для подсчета длины фрагментов.

Данные T-RFLP-PCR оценивали по интенсивности

В RT-PCR при оценке количественного содержания конкретной группы микроорганизмов проводили выделение, контроль качества ДНК и амплификацию гена 16S-rРНК, как было описано выше (iCycler, «BioRad», США), используя не один, а четыре позитивных контроля (ДНК определяемого микроорганизма в серии концентраций геномов). В режиме реального време-

электрофореза в агарозном геле подтвердила, что фрагментация в них не превышает допустимого уровня (рис. 1). Пример паттерна, отражающего результаты электрофореза при анализе состава микробного сообщества, приведен на рисунке 2.

Использованный нами в эксперименте антибиотик стафак-110 обладает бактериостатическим, а в высоких концентрациях — бактерицидным действием в отношении большинства грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Действующее вещество (вирджиниамицин) не всасывается в желудочно-кишечном тракте и не подвергается воздействию пищеварительных ферментов, поэтому создается его высокая концентрация, что способствует длительному антимикробному действию в ЖКТ. Вирджиниамицин не накапливается в органах и тканях и выводится из организма в неизменном виде с фекалиями (32). Пробиотик целлобактерин-Т — это препарат комплексного действия, созданный на основе ассоциации микроорганизмов, выделенных из рубца жвачных (33). Содержит целлюлозолитические и молочнокислые бактерии и обладает свойствами пробиотика профилактического назначения и свойствами ферментного препарата. Бактерии, входящие в состав ассоциации, образуют ферменты, которые способны гидролизовать клетчатку корма, — ксиланазы, пектиназу и β -глюканазу. Это позволяет применять препарат в качестве добавки к кормам с увеличенным содержанием клетчатки, используемым при выращивании животных и птицы.

1. Возрастная динамика общего числа бактерий (геномов/г) в содержимом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 при использовании антибиотика и пробиотика в качестве кормовых добавок (по данным T-RFLP-RT-PCR)

Группа	Отдел ЖКТ	1 сут	7 сут	14 сут	21 сут	35 сут
I (контроль)	12-перстная кишка	$9,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
	Слепая кишка	$7,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{10}$	$8,3 \times 10^{10}$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$1,9 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$7,1 \times 10^9$
	Слепая кишка	$2,5 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^9$	$3,1 \times 10^{10}$	$6,3 \times 10^{10}$
III (пробиотик целлобактерин-Т)	12-перстная кишка	$4,0 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$7,0 \times 10^{10}$
	Слепая кишка	$1,4 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{10}$	$8,3 \times 10^{10}$

Определение общего числа бактерий в исследованных пробах показало, что в обеих опытных группах (с введением в рацион антибиотика и пробиотика) оно было выше, чем в контроле (табл. 1). Наиболее явные различия наблюдали в исследуемых отделах ЖКТ у цыплят в возрасте 1-14 сут. Так, через 1 сут после кормления в группах с применением антибиотика и пробиотика численность бактерий в 12-перстной кишке и слепых отростках была соответственно в 100 и в 10 раз выше по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о более быстром заселении ЖКТ микрофлорой у цыплят из опытных групп, что важно для развития кишечника. В 7- и 14-суточном возрасте у бройлеров из II и III групп численность бактерий в 12-перстной кишке и слепых отделах кишечника в 10 раз превышала контроль, кроме того, в возрасте 14 сут у цыплят из опытных групп в слепых отростках анализируемый показатель был в 100 раз выше, чем у получавших антибиотик, что могло быть связано со сменой рациона и повышением содержания животного белка в комбикорме. На 21-е сут численность бактерий в исследуемых отделах ЖКТ между группами практически не различалась. У 35-суточных цыплят эти показатели в пробах также существенно не различались. Исключение составила II группа, получавшая пробиотик, в которой общая численность бактерий в 12-перстном отделе кишечника была в 10 раз выше, чем в осталь-

ных группах.

Среди представителей нормоценоза кишечника значительную роль играют целлюлозолитические бактерии следующих семейств: *Bacteroidacea* (бактероиды), *Lachnospiracea* (лахноспиры), *Ruminococcacea* (руминококки), *Thermoanaerobacteriaceae* (термоанаэробактерии), *Clostridiaceae* (кlostридии) (34). Поскольку у птиц практически отсутствуют собственные пищеварительные ферменты для расщепления целлюлозы и других некрахмалистых полисахаридов, роль этих микроорганизмов в пищеварении у цыплят-бройлеров трудно переоценить.

На основании произведенного расчета в изучаемых микробных сообществах наибольшей оказалась суммарная доля целлюлозолитиков в слепых отростках у бройлеров из групп, получавших пробиотик и антибиотик (табл. 2).

2. Возрастная динамика численности нормальной микрофлоры (геномов/г) в содержимом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 при использовании антибиотиков и пробиотиков в качестве кормовых добавках (по данным T-RFLP-RT-PCR)

Группа	Отдел ЖКТ	1 сут	7 сут	14 сут	21 сут	35 сут
Целлюлозолитические бактерии						
<i>Целлюлозолитики</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$1,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$	$5,8 \times 10^6$
	Слепая кишка	$7,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$9,4 \times 10^9$	$8,7 \times 10^9$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$1,1 \times 10^9$	$6,8 \times 10^8$	$< 1,0 \times 10^5$	$9,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$
	Слепая кишка	$5,2 \times 10^8$	$3,1 \times 10^{10}$	$6,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{10}$
III (пробиотик целлобак-терин-Т)	12-перстная кишка	$1,7 \times 10^9$	$1,4 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$3,3 \times 10^8$	$8,3 \times 10^9$
	Слепая кишка	$4,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$
<i>Целлюлозолитические бактероиды (сем. Bacteroidaceae)</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$7,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^8$	$9,8 \times 10^5$
	Слепая кишка	$7,0 \times 10^5$	$6,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$4,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$< 1,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
	Слепая кишка	$8,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
III (пробиотик целлобак-терин-Т)	12-перстная кишка	$1,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$
	Слепая кишка	$1,9 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$	$7,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
<i>Целлюлозолитические кlostридии (сем. Clostridiaceae)</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$1,9 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$
	Слепая кишка	$4,5 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$	$6,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^9$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$3,4 \times 10^7$	$6,0 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$
	Слепая кишка	$7,5 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$
III (пробиотик целлобак-терин-Т)	12-перстная кишка	$1,9 \times 10^8$	$4,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$
	Слепая кишка	$2,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	$5,5 \times 10^6$
Молочнокислые бактерии						
<i>Лактобактерии (сем. Lactobacillaceae)</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$5,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$9,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
	Слепая кишка	$1,8 \times 10^7$	$4,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$1,5 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
	Слепая кишка	$5,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^7$	$8,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
III (пробиотик целлобак-терин-Т)	12-перстная кишка	$3,1 \times 10^{10}$	$4,6 \times 10^7$	$8,9 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$	$3,1 \times 10^9$
	Слепая кишка	$3,7 \times 10^8$	$2,7 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$
<i>Бифидобактерии (сем. Bifidobacteriaceae)</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$1,9 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$
	Слепая кишка	$7,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$2,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	$< 1,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	$4,3 \times 10^8$
	Слепая кишка	$3,0 \times 10^6$	$6,6 \times 10^8$	$4,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$6,2 \times 10^8$
III (пробиотик целлобак-терин-Т)	12-перстная кишка	$3,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^9$
	Слепая кишка	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$
Полезные бациллы и селеномонады						
<i>Бациллы (сем. Bacillaceae)</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$1,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$
	Слепая кишка	$7,0 \times 10^5$	$6,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$
II (антибиотик вирджи-ниамидин)	12-перстная кишка	$1,9 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$
	Слепая кишка	$6,0 \times 10^8$	$9,8 \times 10^9$	$3,4 \times 10^7$	$7,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$
III (пробиотик целлобак-терин-Т)	12-перстная кишка	$1,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$5,3 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
	Слепая кишка	$6,5 \times 10^8$	$8,4 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$
<i>Селеномонады (сем. Veillonellaceae)</i>						
I (контроль)	12-перстная кишка	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
	Слепая кишка	$7,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$

		Продолжение таблицы 2				
II (антибиотик вирджи- ниамицин)	12-перстная кишка	$9,0 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7$
	Слепая кишка	$3,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$
III (пробиотик целлобак- терин-Т)	12-перстная кишка	$4,0 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$6,2 \times 10^8$
	Слепая кишка	$1,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^9$	$3,5 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^9$	$6,8 \times 10^8$

В слепых отростках у 1-суточных цыплят из контрольной группы численность целлюлозолитиков была не более 7×10^5 , тогда как в опытных группах оказалась выше приблизительно в 1000 раз. В 12-перстном отделе кишечника в опытных группах бройлеров зарегистрировали в среднем 100-кратные значения этого показателя по сравнению с таковым в контрольной группе. В слепых отростках у 7-суточных бройлеров из опытных групп общая численность целлюлозолитических бактерий приблизительно в 10 раз превышала величину в контрольной группе. В 12-перстном отделе кишечника у птицы из группы, получавшей антибиотик, по сравнению с контрольной группой и цыплятами, в рацион которых вводили пробиотик, численность таких бактерий была в среднем в 10 раз выше. В обоих исследуемых отделах кишечника у 14-суточных бройлеров наибольшую численность целлюлозолитиков наблюдали в группе, получавшей пробиотик, наименьшую — антибиотик. Отмеченные показатели очень важны, поскольку в указанный период происходит смена рациона. В 21-суточном возрасте существенных различий по численности целлюлозолитиков не отмечали. Исключение составила группа с добавлением в рацион антибиотика, где численность целлюлозолитиков оказалась существенно ниже, чем в других группах (возможно, из-за снижения показателя у 14-суточных цыплят). В 35-суточном возрасте наибольшее число целлюлозолитиков наблюдалось в группе, получавшей пробиотик, наименьшее — в контроле.

Среди целлюлозолитических бактерий следует особо выделить бактерии (сем. *Bacteroidaceae*) — формы, способные ферментировать, помимо клетчатки, крахмалистые компоненты кормов (35). Численность этих бактерий в исследуемых отделах кишечника бройлеров на протяжении всего опыта была наибольшей при добавлении в рацион пробиотика, наименьшей — у контрольной птицы. Также стоит отметить род клостридий, которых обычно относят к нормальной микрофлоре кишечника птицы в связи со способностью ферментировать клетчатку кормов (36), однако среди клостридий часто встречаются патогенные виды, вызывающие гастроэнтериты и интоксикацию. Установлено, что число клостридий значительно варьировало, однако в слепых отростках у бройлеров, получавших с кормом пробиотик, регистрируемый показатель был в целом ниже, чем в остальных группах.

Среди молочнокислых микроорганизмов (см. табл. 2) были идентифицированы лакто- и бифидобактерии.

Лактобактерии — представители нормальной микрофлоры кишечника птицы (сем. *Lactobacillaceae*), которые обладают рядом полезных свойств, в том числе антимикробной активностью в отношении патогенных микроорганизмов (37). Наибольшее число лактобактерий выявили в исследуемых отделах кишечника у бройлеров из II (антибиотик) и III (пробиотик) групп, наименьшее — в контрольной группе. При этом в слепых отростках у цыплят из III группы лактобактерий было в среднем в 10-100 раз больше (в зависимости от возраста), чем у бройлеров, получавших антибиотик.

Бифидобактерии (сем. *Bifidobacteriaceae*) в кишечнике птицы также

обладают антимикробной активностью в отношении патогенных микроорганизмов (38). Больше всего бифидобактерий обнаружили в исследуемых отделах кишечника у особей из II и III групп, наименьшее количество — в контроле. В слепых отростках у бройлеров из III группы численность бифидобактерий в среднем в 10-100 раз (в зависимости от возраста) превышала таковую во II группе.

В ЖКТ бройлеров также были обнаружены полезные бактерии (сем. *Bacillaceae*), обладающие значительной антимикробной активностью в отношении патогенных микроорганизмов, и селеномонады (сем. *Veillonellaceae*), способные разлагать органические кислоты (39) (см. табл. 2).

Наибольшее число бактерий выявили в исследуемых отделах кишечника у бройлеров, получавших антибиотик и пробиотик, наименьшее — в контрольной группе. При этом в III группе (пробиотик) по сравнению со II группой (антибиотик) в слепых отростках численность бактерий оказалась выше приблизительно в 10-100 раз (в зависимости от возраста). Максимальное число селеномонад было выявлено в исследуемых отделах кишечника у бройлеров из групп с добавкой антибиотика и пробиотика в рационы, наименьшее — в контрольной группе.

3. Возрастная динамика численности энтеробактерий и актиномицетов (геномов/г) в содержимом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 при использовании антибиотика и пробиотика в качестве кормовых добавок (по данным T-RFLP-RT-PCR)

Группа	Отдел ЖКТ	1 сут	7 сут	14 сут	21 сут	35 сут
Энтеробактерии (сем. <i>Enterobacteriaceae</i>)						
I (контроль)	12-перстная кишка	2,7×10 ⁶	3,5×10 ⁶	9,2×10 ⁵	1,1×10 ⁸	4,2×10 ⁶
	Слепая кишка	7,0×10 ⁵	4,8×10 ⁸	6,3×10 ⁸	7,0×10 ⁹	3,3×10 ⁹
II (антибиотик вирджиниамицин)	12-перстная кишка	6,1×10 ⁸	7,7×10 ⁸	7,5×10 ⁶	8,7×10 ⁷	5,5×10 ⁸
	Слепая кишка	4,4×10 ⁸	3,5×10 ⁹	7,2×10 ⁸	1,5×10 ⁹	2,1×10 ⁹
III (пробиотик целлобактерин-Т)	12-перстная кишка	4,0×10 ⁶	5,6×10 ⁶	1,4×10 ⁷	3,8×10 ⁷	2,0×10 ⁷
	Слепая кишка	1,6×10 ⁹	4,6×10 ⁹	1,1×10 ⁹	2,0×10 ⁹	5,2×10 ⁷
Актиномицеты (род <i>Actinomyces</i>)						
I (контроль)	12-перстная кишка	3,5×10 ⁵	2,0×10 ⁴	2,0×10 ⁴	1,4×10 ⁷	1,1×10 ⁶
	Слепая кишка	1,5×10 ⁷	5,7×10 ⁸	3,8×10 ⁹	1,6×10 ⁹	3,0×10 ¹⁰
II (антибиотик вирджиниамицин)	12-перстная кишка	5,1×10 ⁷	1,8×10 ⁷	1,0×10 ⁵	1,0×10 ⁵	7,1×10 ⁷
	Слепая кишка	4,3×10 ⁹	1,4×10 ¹⁰	5,7×10 ⁸	1,6×10 ⁹	5,7×10 ⁹
III (пробиотик целлобактерин-Т)	12-перстная кишка	8,0×10 ⁸	2,4×10 ⁵	5,1×10 ⁶	3,2×10 ⁷	2,8×10 ⁷
	Слепая кишка	1,5×10 ⁹	1,1×10 ¹⁰	8,6×10 ⁹	2,0×10 ⁹	6,9×10 ⁹

Энтеробактерии (сем. *Enterobacteriaceae*) (сальмонелла, кишечная палочка, протей и др.) относятся к нежелательной микрофлоре ЖКТ птицы, так как часто служат причиной гастроэнтеритов (40). Результаты анализа структуры микробного сообщества показывают, что наименьшее содержание указанной группы микроорганизмов наблюдалось в кишечнике у бройлеров из контрольной группы и группы, в рацион которой вводили пробиотик. При этом у исследованных цыплят наибольшую численность энтеробактерий выявили в слепых отростках (табл. 3).

Актиномицеты (род *Actinomyces*) тоже считаются нежелательными обитателями кишечника птицы как обычные возбудители актиномикозов (41). Анализ показал, что с 1-х по 14-е сут эти микроорганизмы имели наименьшую численность в содержимом обоих отделов кишечника у контрольных бройлеров из I группы, с 14-х по 35-е сут — в слепых отростках у цыплят из II и III групп, получавших соответственно антибиотик и пробиотик.

Молекулярно-генетический анализ не выявил патогенную микрофлору в ЖКТ бройлеров: доля стафилококков, фузобактерий, пастерелл и кампилобактерий оказалась низкой, при этом существенные различия между показателями в контрольной и опытных группах отсутствовали.

Кроме того, в ЖКТ у всех исследованных особей были обнаружены транзитные микроорганизмы, попадающие в пищеварительный тракт птицы с кормом и не играющие значительной роли в процессах ферментации. Исследования показали, что численность таких микроорганизмов в слепых отростках у 1-суточных цыплят из группы, получавшей пробиотик, существенно ниже, чем в ЖКТ у бройлеров из других групп. Это может свидетельствовать о более раннем заселении ЖКТ полезной микрофлорой у цыплят, получавших пробиотик, по сравнению с другими группами бройлеров. При этом с 7- до 21-суточного возраста в опытных группах численность транзитной микрофлоры возрастала, что, вероятно, связано с изменением основного рациона (табл. 4).

4. Возрастная динамика численности транзитной микрофлоры (геномов/г) в содержимом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 при использовании антибиотика и пробиотика в качестве кормовых добавок (по данным T-RFLP-RT-PCR)

Группа	Отдел ЖКТ	1 сут	7 сут	14 сут	21 сут	35 сут
I (контроль)	12-перстная кишка	$2,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
	Слепая кишка	$2,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$2,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$
II (антибиотик стафак-110)	12-перстная кишка	$2,0 \times 10^6$	$9,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$9,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$
	Слепая кишка	$7,5 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^5$	$8,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$
III (пробиотик целлюло-бактерин-Т)	12-перстная кишка	$7,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
	Слепая кишка	$1,9 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^7$

Таким образом, анализ микрофлоры желудочно-кишечного тракта методом T-RFLP—RT-PCR, выполненный у цыплят-бройлеров, показал, что введение в рацион птицы антибиотика и пробиотика способствовало увеличению общего числа бактерий, причем численность представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (целлюлозолитические бактерии, лактобактерии, бифидобактерии, бациллы, селеномонады) возрастала, а доля нежелательных энтеробактерий, актиномицетов снижалась. У бройлеров из группы, получавшей пробиотик, по сравнению с птицей, в рацион которой добавляли антибиотик, в исследуемых отделах кишечника было больше целлюлозолитических бактерий, в слепых отростках — в 10-100 раз больше лактобактерий, бифидобактерий, бацилл, а также меньше клостридий и транзитных бактерий. Многочисленные исследования пробиотических препаратов уже подтвердили их эффективность в птицеводстве, что отражено в зоотехнических показателях, однако только с использованием современных молекулярных методов идентификации микрофлоры желудочно-кишечного тракта (в частности, T-RFLP-анализ с RT-PCR) можно определить, на представителей каких таксономических групп микроорганизмов влияет тот или иной препарат, для дополнительного обоснования рациональности его использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фисинин В., Сурай П. Первые дни жизни цыплят: от защиты от стрессов к эффективной адаптации. Птицеводство, 2012, 2: 11-15.
2. Егоров И., Имангулов Ш., Харламов К., Паньков П., Розанов Б., Егорова Т. Пребиотики в питании бройлеров. Комбикорма, 2007, 5: 71-72.
3. Сурай П., Фисинин В.И. Природные антиоксиданты в эмбриогенезе кур и защита от стрессов в постнатальном развитии. Сельскохозяйственная биология, 2013, 2: 3-18 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.2.3rus, 10.15389/agrobiology.2013.2.3eng).
4. Rantala M., Nurmi E. Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chickens by flora of the alimentary tract of chickens. Br. Poultry Sci., 1973, 14: 627-630.
5. Rigby C., Pettit J. Some factors affecting *Salmonella typhimurium* infection and shedding

- in chickens raised on litter. *Avian Dis.*, 1979, 23: 442-455.
6. Dübner J., Richards J. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Sci.*, 2005, 84: 634-643 (doi: 10.1093/ps/84.4.634).
 7. Зон Г. Аутохтонная микрофлора птицы. *Птицеводство*, 1996, 2: 14-16.
 8. Первова А. Эффективность использования пробиотиков в промышленном птицеводстве. *Сельскохозяйственная биология*, 2003, 4: 24-28.
 9. Фисинин В.И., Сурай П. Кишечный иммунитет у птиц: факты и размышления. *Сельскохозяйственная биология*, 2013, 4: 3-25 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.4.3rus, 10.15389/agrobiology.2013.4.3eng).
 10. Георгиевский В.И. *Физиология сельскохозяйственных животных*. М., 1990.
 11. Павлова Н.В. Киржаев Ф.С., Лапискайте Р. Значение нормальной микрофлоры пищеварительного тракта птиц для их организма. *Био*, 2002, 1: 4-7.
 12. Лобзин Ю.В., Макарова В.Г., Корвякова Е.Р. *Дисбактериоз кишечника*. СПб, 2006.
 13. Егоров И., Мягих Ф. Пробиотик Бифидум-СХЖ. *Птицеводство*, 2003, 3: 9.
 14. Бовкун Г., Трошин В., Малик Н., Малик Е. Дисбактериозы молодняка — проблема актуальная. *Птицеводство*, 2005, 6: 25-27.
 15. Никонов И. Влияние аминокислотного состава комбикормов на микробный фон цыплят-бройлеров и кур-несушек. *Мат. XVII Межд. конф. (ВНАП) «Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве»*. Сергиев Посад, 2012: 235-239.
 16. Лаптев Г. Кормление животных и микрофлора. *Животноводство России*, 2010, 2: 56.
 17. Van Immerseel F., De Zutter L., Houf K., Pasmans F., Haeserbroeck F., Ducalette R. Strategies to control Salmonella in the broiler production chain. *World's Poultry Sci. J.*, 2009, 65: 367-384 (doi: 10.1017/S0043933909000270).
 18. Yang Y., Iji P.A., Choct M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Sci. J.*, 2009, 65: 97-114. (doi: 10.1017/S0043933909000008).
 19. Илиеш В., Горячева М. Альтернатива антибиотикам есть. *Комбикорма*, 2012, 6: 114-115.
 20. Vilà B., Esteve-García E., Brufau J. Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poultry Sci. J.*, 2010, 65: 369-380 (doi: 10.1017/S0043933910000474).
 21. Методические рекомендации по использованию пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков в птицеводстве /Под ред. В.И. Фисинина, И.А. Егорова, Ш.А. Имангулова. Сергиев Посад, 2008.
 22. Лаптев Г., Никонов И., Кряжевских Л., Егоров И. T-RFLP- анализ микрофлоры кишечника — основа выбора кормовых добавок для птицы. *Птицеводство*, 2009, 9: 25.
 23. Тимошко М. *Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных*. Кишинев, 1990.
 24. Engberg R., Hedemann M., Lesser T., Jensen B. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Sci.*, 2000, 79: 1311-1319 (doi: 10.1093/ps/79.9.1311).
 25. Арсениук А., Павлова И., Игнатъев П. Исследование процесса L-трансформации в популяции сальмонелл методами электронной и лазерной интерференциальной микроскопии. *Сельскохозяйственная биология*, 2013, 6: 55-60 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.55rus, 10.15389/agrobiology.2013.6.55eng).
 26. Zhu X.Y., Zhong T., Pandya Y., Joerger R.D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(1): 124-137 (doi: 10.1128/AEM.68.1.124-137.2002).
 27. Amit-Romach E., Sklan D., Unil Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Sci.*, 2004, 83: 1093-1098 (doi: 10.1093/ps/83.7.1093).
 28. Лаптев Г. Метагеномные исследования микрофлоры кишечника кур. *Мат. XVII Межд. конф. (ВНАП) «Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве»*. Сергиев Посад, 2012: 212-215.
 29. Tótok V., Ophel-Keller K., Loo M., Hughes R. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(3): 783-791 (doi: 10.1128/AEM.01384-07).
 30. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. *Молекулярная биология*. М., 2012.
 31. Манукян В., Джавадов Э., Дмитриева М., Лаптев Г., Никонов И., Новикова Н., Ильина Л. Применение ферментативного пробиотика в кормлении цыплят-бройлеров. *Птица и птицепродукты*, 2013, 5: 22-24.
 32. Пономаренко Ю., Фисинин В., Егоров И., Пономаренко В. *Корма, кормовые добавки, биологически активные вещества для сельскохозяйственной птицы*. М., 2009.
 33. Кислюк С., Новикова Н., Лаптев Г. Ферментативный пробиотик Целлобактерин — ответ на многие вопросы. *Аграрный эксперт*, 2008, 1: 26-27.

34. Ушакова Н., Некрасов Р., Мелешко Н., Лаптев Г., Ильина Л., Козлова А., Нифатов А. Влияние *Bacillus subtilis* на микробное сообщество рубца и его членов, имеющих высокие коэффициенты корреляции с показателями пищеварения, роста и развития хозяина. *Микробиология*, 2013, 82(4): 456-463.
35. Тараканов Б., Николичева Т. Биология целлюлозолитических бактерий, используемых для приготовления пробиотика целлобактерина. *Доклады РАСХН*, 2000, 3: 42-44.
36. Тараканов Б. Механизм действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных. *Ветеринария*, 2000, 1: 47-54.
37. Lan P., Sakamoto M., Venno Y. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejuna and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiol. Immunol.*, 2004, 48(12): 917-929.
38. Owens B., Tucker L., Collins M., McCracken K. Effects of different feed additives alone or in combination on broiler performance, gut microflora and ileal histology. *Br. Poultry Sci.*, 2008, 49(2): 202-212 (doi: 10.1080/00071660802004890).
39. Бушов А., Курманаева В. Целлобактерин-Т в кормлении бройлеров. *Животноводство России*, 2012, Спецвыпуск по птицеводству: 63.
40. Четли Э. Антибиотики для животных: аспекты неправильного применения. *Био*, 4: 8-12.
41. Иллюстрированный атлас болезней птиц /Под ред. Б.Ф. Бессарабова. М., 2006.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
и технологический институт птицеводства
Россельхозакадемии,
141300 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад,
ул. Птицеградская, 10,
e-mail: alena_fisinina@mail.ru*

*Поступила в редакцию
15 июня 2014 года*

GUT MICROBIOTA OF BROILER CHICKENS INFLUENCED BY PROBIOTICS AND ANTIBIOTICS AS REVEALED BY T-RFLP AND RT-PCR

A.A. Grozina

*All-Russian Research and Technological Institute of Poultry, Russian Academy of Agricultural Science, 10, ul. Pti-
tsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141300 Russia, e-mail alena_fisinina@mail.ru*

Supported by grant of the Russian Science Foundation, project № 14-16-00140.

Received June 15, 2014

doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.46eng

Abstract

In poultry, and birds in general, the gut is not only the first line of the defense from exogenous pathogens, but also the biggest immunity organ. The microflora inhabiting blind gut plays multifunctional role in the maintenance of homeostasis in macroorganism, being involved in different processes including fodder digestion. Probiotic, antibiotic, prebiotic, symbiotic preparations, enzymes, etc., affecting directly or indirectly the gut microflora, can thus increase daily weigh growth and viability in chickens, and the slaughter yield. They also improve a digestibility of fodder nutrients, quality and sanitary condition of the birds. However, the influence of these agents on gut microflora in chickens is still not cleared up. Recent molecular approaches allow studying microbial biodiversity without traditional limitations we are faced with when applying microbiological techniques. By T-RFLP and RT-PCR, the composition and growth dynamics of gut microflora were examined in the Cobb 500 broiler chickens fed with probiotic Cellobacterin-T and antibiotic Stafak-110 as feed additives to the complete diet. By these methods, the probiotic and antibiotic additives were shown to contribute to the development of microbiota. In particular they increased the total number of bacteria, what is more, the normal gastrointestinal flora, i.e. cellulolytic bacteria, lactobacilli, bifidobacteria, bacilli, *Selenomonas* species, increased, while the unwanted enterobacteria and actinomycetes decreased. In case we used the probiotics in poultry diet when compared to antibiotics, in the studied parts of the intestinal of broiler chickens there were more cellulolytic bacteria, and in the blind gut the number of lactobacilli, bifidobacteria and bacilli was 10-100 times higher, while clostridia and transit bacteria number decreased. Numerous investigations affirmed the effectiveness of probiotics in poultry basing on zootechnical parameters, however, only molecular identification of the gut microbiota members by means of T-RFLP-PCR and RT-PCR analysis allows detecting and attributing their taxonomic groups influenced by a specific feed additive for further justification of its rational use.

Keywords: broiler chickens, digestive tract, duodenum, blind gut, microflora, pathogenic microflora, T-RFLP, RT-PCR.