

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОМА СЛЕПЫХ ОТРОСТКОВ КИШЕЧНИКА У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ И ЕГО ИЗМЕНЕНИЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМБИКОРМОВ С ПОДСОЛНЕЧНЫМ ШРОТОМ И СНИЖЕННОЙ ОБМЕННОЙ ЭНЕРГИЕЙ*

Л.А. ИЛЬИНА¹, Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ¹, И.Н. НИКОНОВ¹, В.А. ФИЛИППОВА¹,
Г.Ю. ЛАПТЕВ¹, Н.И. НОВИКОВА¹, А.А. ГРОЗИНА², Т.Н. ЛЕНКОВА²,
В.А. МАНУКЯН², В.И. ФИСИНИН², И.А. ЕГОРОВ²

В настоящее время продукты переработки подсолнечника как самого дешевого источника белка растительного происхождения по сравнению с соевыми жмыхами и шротами рассматриваются в качестве альтернативы последним в рационе сельскохозяйственной птицы. Однако подсолнечный шрот имеет более низкую энергетическую ценность и содержит меньше необходимого птице лизина, в то же время включая существенно большее количество некрахмалистых полисахаридов, которые птица не способна усваивать самостоятельно из-за отсутствия необходимых ферментов (амилаз, целлюлаз и др.). Переваривание указанных компонентов рациона возможно только благодаря микробным ферментам. У птицы именно в слепых отростках содержится кишечника задерживается на самое длительное время и происходят основные процессы микробного протеолиза, расщепления целлюлозы и крахмала. Используя NGS-секвенирование и ПЦР в реальном времени, мы сравнили численность и состав бактериального сообщества в слепых отростках кишечника у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в возрасте 36 сут, которые получали рационы на основе комбикормов, содержащих соевый и подсолнечный шроты. Вопреки традиционным взглядам, исследуемый микробиоценоз характеризовался богатой и разнообразной таксономической структурой и включал как облигатных представителей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) птицы (семейств *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, фила *Bacteroidetes*), так и ряд неидентифицированных таксонов. Классическим представлениям также противоречили полученные данные о том, что при этом энтерококки и бифидобактерии занимали в сообществе минорное положение, а типичные патогенные микроорганизмы ЖКТ птицы (*Camphylobacter* sp., *Staphylococcus* sp.) полностью отсутствовали. В представляемом исследовании были впервые детально охарактеризованы изменения в составе микробиома слепых отростков в зависимости от используемых комбикормов. Установлено, что включение в рецептуру комбикорма 25 % подсолнечного шрота приводило к увеличению общей бактериальной численности в 14,70 раза, а также к снижению доли амилотических бактерий семейств из фила *Bacteroidetes* в 1,40 раза и семейств *Clostridiaceae* — в 1,20 раза, целлюлозолитических бактерий семейств *Ruminococcaceae* — в 1,16 раза, *Lachnospiraceae* — в 1,48 раза, что свидетельствует об уменьшении метаболизма легкогидролизуемых компонентов и клетчатки корма. Также изменялось содержание облигатных представителей кишечной нормофлоры птицы: доля бактерий рода *Lactobacillus* sp. увеличивалась в 3,04 раза, порядка *Bacillales* — в 1,50 раза, тогда как родов *Bifidobacterium* sp. и *Enterococcus* sp. — уменьшалась соответственно в 3 и 10 раз. В отличие от классических представлений, свидетельствующих о росте содержания нежелательной микрофлоры в ЖКТ при высоком количестве некрахмалистых полисахаридов в рационах птицы, в слепых отростках бройлеров, получающих в составе комбикорма 25 % подсолнечного шрота, отмечалось достоверное снижение доли бактерий рода *Escherichia* sp. (в 55 раз), а также семейств *Erysipelotrichaceae* (в 2,50 раза) и *Sutterellaceae* (в 1,80 раз), включающих ряд видов, способных вызывать дисбиотические нарушения в макроорганизме. Кроме того, было установлено, что с перестройкой бактериального сообщества сопряжено изменение показателей продуктивности птицы. Живая масса как у петушков, так и у курочек оказалась максимальной (2142,0±45,40 г) в 36-суточном возрасте в контрольной группе, не получавшей подсолнечный шрот, по сравнению с показателем в опытной группе (2017,0±53,30 г). Наряду с этим затраты корма на выращивание птицы в опытной группе возросли на 13 %.

Ключевые слова: микрофлора слепых отростков, цыплята-бройлеры, продуктивность бройлеров, бактериальное сообщество, NGS-секвенирование, ПЦР в реальном времени.

Использование в рационах сельскохозяйственной птицы продуктов переработки подсолнечника как самого дешевого источника белка расти-

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

тельного происхождения привлекает внимание многих специалистов. Однако при составлении рациона необходимо учитывать недостатки, присущие такому корму: по сравнению с соевым подсолнечный шрот не только имеет более низкую энергетическую ценность (139-209 Ккал на 100 г) и содержит на 1,5 % меньше необходимого птице лизина, но и включает существенно большее количество некрахмалистых полисахаридов, в основном представленных целлюлозой, гемицеллюлозой, пектиновыми веществами и лигнином (1, 2). Отметим, что птица не способна самостоятельно усваивать некрахмалистые полисахариды вследствие отсутствия необходимых ферментов (амилаз, целлюлаз и др.). Переваривание этих компонентов возможно только благодаря микробиальным ферментам, в связи с чем сложно переоценить роль микроорганизмов в пищеварении птицы: вместе с расщеплением нутриентов до доступных продуктов они дополнительно обеспечивают ее многими необходимыми веществами — соединениями с антибиотическими свойствами, белками, гормонами, витаминами и др. (3-6).

Микробиология пищеварения весьма сложна и малоизученна (7-9), чем, в частности, объясняется актуальность исследований микробиоценоза кишечника птицы на фоне рационов различной структуры. Большинство имеющихся сведений об этой микрофлоре получены с использованием классических микробиологических методов, согласно которым основу сообщества составляют бифидобактерии, стрептококки, лактобактерии, лактаферментирующие бактерии, эубактерии, бактериоиды и энтеробактерии (3, 10, 11). Однако уже очевидно, что значительная часть микроорганизмов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) — некультивируемые виды (12).

Уникальные возможности для изучения состава микробиома открывают современные молекулярно-генетические методы. Так, в кишечнике птицы обнаружено до 140 родов бактерий, из которых только 10 % идентифицированы по бактериальному гену 16S-rPHK, а остальные принадлежат к новым видам и, возможно, родам (13-15). Разрешающая способность и производительность ПЦР-анализа и NGS-секвенирования (next generation sequencing) дают достоверную информацию обо всех изменениях микробиома кишечника под действием определенных факторов (16). Несмотря на широкое использование указанных методов для изучения численности и таксономического разнообразия микроорганизмов в кишечнике человека (17, 18), в отношении птицы имеются лишь единичные сообщения. В частности, они касаются состояния микробиома ЖКТ при заражении птицы патогенными бактериями *Campylobacter jejuni* (19, 20), под влиянием кокцидиостатиков (21) и в связи с продуктивностью (22, 23).

В представляемом исследовании, используя NGS-секвенирование и ПЦР в реальном времени, мы показали, что у бройлеров, вопреки традиционным взглядам, микробиом слепых отростков кишечника имеет богатую и разнообразную таксономическую структуру, включает как облигатных представителей ЖКТ, так и неидентифицированные таксоны, при этом энтерококки и бифидобактерии занимают в сообществе минорное положение, а типичные патогенные микроорганизмы полностью отсутствуют. Впервые с помощью этого подхода были детально охарактеризованы изменения в структуре микробиома слепых отростков у бройлеров под влиянием подсолнечного шрота, что сопровождалось снижением продуктивности.

Цель работы заключалась в изучении особенностей бактериального сообщества в слепых отростках у цыплят-бройлеров на фоне рационов с соевым и подсолнечным шротом.

Методика. Опыты проводили в виварии ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП» на 4 группах цыплят кросса Cobb 500 (по 35 особей, аналогичных

по живой массе). Птица получала полнорационные комбикорма с питательностью согласно рекомендациям Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства (ВНИТИП) (1). В 21-суточном возрасте в рацион цыплят вводили комбикорм (ВНИТИП) без включения подсолнечного шрота (контроль) и с включением 25 % подсолнечного шрота («ЭФКО», Россия) при снижении количества обменной энергии на 4,88 Ккал/100 г и сырого протеина на 1,01 %. Живую массу цыплят определяли на 21-е и 36-е сут индивидуальным взвешиванием, потребление корма — ежедневным учетом заданных кормов и их остатков по общепринятым методикам (24). Отбор материала содержимого слепых отростков ЖКТ для молекулярно-генетических исследований проводили у 6 цыплят (по 3 из каждой группы) при убое в 36-суточном возрасте со строгим соблюдением стерильности в соответствии с установленными требованиями (25).

Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. Состав и структуру популяции бактерий определяли методом NGS-секвенирования: амплификацию проводили с помощью прибора Verity («Life Technologies, Inc.», США) и праймеров 343F/806R (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3' и 5'-GGACTACNVGGGTWTСТААТ-3'), фланкирующих участок V3-V4 гена 16S-pPHK, секвенирование — на установке MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США) согласно рекомендациям производителя. Для обработки ридов 2×300 нт и определения таксономической принадлежности последовательностей ДНК до рода использовали биоинформатическую платформу CLC Bio GW 7.0 («Qiagen N.V.», Нидерланды). ПЦР в реальном времени для учета общей численности бактерий выполняли на амплификаторе ДТ Lite-4 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), применив «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (ЗАО «Синтол», Россия) и праймеры Eub338/Eub518 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' и 5'-ATTACCGCGG-CTGCTGG-3'), в следующем режиме: 3 мин при 95 °С; 40 циклов — 13 с при 95 °С, 13 с при 57,6 °С, 30 с при 72 °С.

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Результаты. В настоящем исследовании основное внимание было обращено на микробиом слепых отростков, так как известно, что именно в этом отделе содержимое кишечника задерживается на самое длительное время и происходят основные процессы микробиального протеолиза, расщепления целлюлозы и крахмала (26, 27). Полученные данные подтвердили неодинаковый эффект исследуемых рационов в отношении структуры микробиома.

При таксономическом анализе последовательностей ДНК их значительную долю (в контроле — $7,17 \pm 0,28$ %, в опыте — $7,91 \pm 0,37$ %) не удалось отнести ни к одному известному таксону (табл. 1). О подобном сообщалось и ранее (12-15), что указывает на полное отсутствие знаний о существовании таких таксонов, а потому и попыток их изучения. Идентифицированные бактерии по результатам анализа были отнесены к пяти филам. В слепых отростках ЖКТ доминировали представители филы *Firmicutes* из семейств *Ruminococcaceae* ($19,81 \pm 0,97$ %) и *Clostridiaceae* ($23,06 \pm 1,19$ %), обладающие амило- и целлюлозолитическими ферментами, а также филы *Bacteroidetes* ($29,60 \pm 1,49$ %) с амило- и протеолитической активностью. В наших исследованиях подтвердились данные ряда авторов, показавших с помощью NGS-секвенирования, что в слепых отростках кишечника бройлеров доминируют бактерии филы *Firmicutes* (19,

21), а также родов *Clostridium* и *Bacteroides* (23). В то же время полученные нами результаты противоречат другим сообщениям, в которых указывается на доминирование представителей фило *Proteobacteria* (22). Вероятно, некоторые расхождения при анализе микрофлоры слепых отростков птицы методом NGS-секвенирования могут быть связаны как с различиями в изучаемом регионе гена 16S-рРНК и приборной базы, так и с другими факторами — климатическими условиями, санитарно-гигиенической обстановкой, рационом, применением антибиотиков, возрастом и кроссом птицы (19, 21).

1. Численность и соотношение бактериальных таксонов в слепых отростках кишечника у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в возрасте 36 сут в зависимости от структуры рациона ($X \pm x$, виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», 2015 год)

Показатель	I группа (контроль, $n = 3$)	II группа (опыт, $n = 3$)
Общая численность бактерий, экв. геномов/г содержимого	$3,4 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^8$	$5,0 \times 10^{10} \pm 1,4 \times 10^9$
Встречаемость таксона, %:		
фила <i>Bacteroidetes</i>	$29,60 \pm 1,49$	$21,13 \pm 0,95^*$
род <i>Bacteroides</i> sp.	$18,50 \pm 0,93$	$16,62 \pm 0,83^*$
род <i>Alistipes</i> sp.	$10,62 \pm 0,52$	$4,39 \pm 0,20^*$
неклассифицированные <i>Rikenellaceae</i>	$0,39 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01^*$
фила <i>Firmicutes</i>	$58,48 \pm 2,94$	$68,95 \pm 2,75^*$
неклассифицированные <i>Firmicutes</i>	$6,55 \pm 0,34$	$5,84 \pm 0,04^*$
класс <i>Clostridia</i>	$42,12 \pm 2,01$	$35,49 \pm 1,77^*$
неклассифицированные <i>Clostridia</i>	$0,55 \pm 0,13$	$0,66 \pm 0,03$
неклассифицированные <i>Clostridiales</i>	$7,53 \pm 0,36$	$9,35 \pm 0,34^*$
семейство <i>Clostridiaceae</i>	$23,06 \pm 1,19$	$19,43 \pm 0,87^*$
род <i>Clostridium</i> sp.	$7,47 \pm 0,33$	$5,15 \pm 0,22^*$
род <i>Butyricoccus</i> sp.	$3,25 \pm 0,15$	$1,36 \pm 0,06^*$
род <i>Flavonifractor</i> sp.	$0,90 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,01^*$
род <i>Pseudoflavonifractor</i> sp.	$0,73 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,02^*$
род <i>Oscillibacter</i> sp.	$0,60 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,00^*$
сем. <i>Ruminococcaceae</i>	$19,81 \pm 0,97$	$17,14 \pm 0,84^*$
неклассифицированные <i>Ruminococcaceae</i>	$13,05 \pm 0,64$	$11,13 \pm 0,50^*$
род <i>Faecalibacterium</i> sp.	$5,98 \pm 0,29$	$5,14 \pm 0,22^*$
род <i>Subdoligranulum</i> sp.	$0,40 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,02$
род <i>Ruminococcus</i> sp.	$0,29 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,01^*$
семейство <i>Eubacteriaceae</i>	$0,14 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
семейство <i>Lachnospiraceae</i>	$1,12 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,04^*$
род <i>Lactobacillus</i> sp.	$8,80 \pm 0,43$	$26,79 \pm 0,65^*$
род <i>Enterococcus</i> sp.	$0,10 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00^*$
порядок <i>Bacillales</i>	$0,29 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,02^*$
семейство <i>Erysipelotrichaceae</i>	$0,47 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01^*$
фила <i>Actinobacteria</i>	$0,60 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,05^*$
род <i>Bifidobacterium</i> sp.	$0,18 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,00^*$
семейство <i>Coriobacteriaceae</i>	$0,42 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,02^*$
фила <i>Proteobacteria</i>	$4,14 \pm 0,21$	$0,74 \pm 0,03^*$
род <i>Escherichia</i> sp.	$2,77 \pm 0,12$	$0,05 \pm 0,00^*$
семейство <i>Sutterellaceae</i>	$0,59 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,11^*$
род <i>Bilophila</i> sp.	$0,30 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01^*$
фила <i>Tenericutes</i> (род <i>Anaeroplasma</i> sp.)	$0,01 \pm 0,00$	—
неклассифицированные последовательности	$7,17 \pm 0,28$	$7,91 \pm 0,37^*$

Примечание. I и II группа — соответственно основной рацион без включения подсолнечного шрота и с включением 25 % подсолнечного шрота при снижении количества обменной энергии на 4,88 Ккал/100 г и сырого протеина на 1,01 %. Прочерк означает, что микроорганизмы присутствовали в количестве ниже предела достоверного определения методом NGS-секвенирования.

* Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Другие бактерии с целлюлозо- и амилитическими свойствами из семейств *Lachnospiraceae* ($1,12 \pm 0,05$ %) и *Eubacteriaceae* ($0,14 \pm 0,01$ %) присутствовали в меньшем количестве (см. табл. 1). Ранее считалось, что бактерии семейств *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* обитают только в рубце жвачных (4). Кроме того, благодаря высокой чувствительности NGS-секвенирования были выявлены представители родов *Alistipes* и *Faecalibacterium* (продуценты короткоцепочечных жирных кислот), которые ранее исследователям не удавалось обнаружить при использовании других молекулярно-генетических методов (28). Доля *Escherichia* sp. также была

невелика ($2,77 \pm 0,12$ %), что не согласуется с традиционным мнением о них как типичных обитателях кишечника птицы (4).

Мы обнаружили высокую долю облигатных представителей ЖКТ птицы из рода *Lactobacillus* ($8,80 \pm 0,43$ %), которые способны к конкурентному вытеснению патогенов благодаря синтезу органических кислот и бактериоцинов (3). Стоит отметить, что некоторыми исследователями в слепых отростках также был выявлен значительный процент представителей рода *Lactobacillus* (23).

Другие бактерии с аналогичными свойствами из семейства *Bifidobacteriaceae* и рода *Enterococcus* sp. в сообществе были минорными (менее 1 %), что тоже не соответствует традиционным представлениям. Минорными были также бактерии фил *Actinobacteria*, *Tenericutes*, семейств *Erysipelotrichaceae* и *Sutterellaceae*. Интересно, что другие облигатные обитатели микрофлоры ЖКТ птицы — лактатферментирующие (*Selenomonas* sp., *Megasphaera* sp.) и типичные патогенные виды (*Campylobacter* sp., *Staphylococcus* sp.), населяющие ЖКТ, в слепых отростках у исследованных цыплят полностью отсутствовали.

Добавление в рацион цыплят-бройлеров 25 % подсолнечного шрота привело к увеличению общей численности бактерий в 14,70 раза (см. табл. 1). Известно, что растворимые некрахмалистые полисахариды способны повышать вязкость химуса, а нерастворимые образуют полимерный матрикс, препятствующий равномерному перемешиванию пищеварительных масс, в результате чего снижается интенсивность пристеночного пищеварения (29). Поэтому, вероятно, именно менее интенсивное продвижение содержимого по пищеварительному тракту птицы способствовало скоплению бактерий и, соответственно, увеличению их общей численности.

В структуре микробиома слепых отростков у цыплят-бройлеров из II группы (см. табл. 1) достоверно уменьшалась доля представителей филы *Bacteroidetes* sp. (в 1,40 раза), а также семейства *Clostridiaceae* (в 1,20 раза), обладающих, как правило, ферментами для расщепления крахмалистых полисахаридов (амилазы и др.). Кроме того, снизился процент целлюлозолитиков — семейств *Ruminococcaceae* (в 1,16 раза) и *Lachnospiraceae* (в 1,48 раза). Таким образом, увеличение содержания некрахмалистых полисахаридов в рационе привело к уменьшению количества бактерий с амило- и целлюлозолитическими свойствами, что свидетельствует о снижении активности метаболизма легкогидролизуемых компонентов и клетчатки кормов.

Также выявлено расхождение между полученными результатами и традиционным утверждением о том, что высокое содержание некрахмалистых полисахаридов в кормах и, соответственно, замедление продвижения кишечного содержимого способствуют росту численности патогенной и другой нежелательной микрофлоры. Напротив, результаты наших исследований свидетельствуют об обратном эффекте: при введении в рацион 25 % подсолнечного шрота доля возбудителей инфекционных заболеваний семейства *Sutterellaceae* достоверно снижалась в 1,80 раза, семейства *Erysipelotrichaceae* — в 2,50 раза, доля представителей рода *Escherichia* sp., среди которых могут встречаться виды, способные вызывать дисбиотические нарушения макроорганизма, — в 55 раз (см. табл. 1). Кроме того, на фоне рациона с добавлением подсолнечного шрота обнаружилось увеличение доли облигатных представителей кишечной нормофлоры птицы — молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* (в 3,04 раза) и бацилл порядка *Bacillales* (в 1,50 раза), которые, как правило, благодаря синтезу органических кислот и бактериоцинов способны к антагонистическому вытеснению патогенных видов (3). В то же время отмечалось достоверное сниже-

ние доли других бактерий с аналогичными свойствами, присутствующих в сообществе слепых отростков в минорных количествах, — родов *Bifidobacterium* sp. (в 3 раза) и *Enterococcus* sp. (в 10 раз).

С изменениями в структуре бактериального ценоза оказалась связана продуктивность исследуемых цыплят-бройлеров (табл. 2). Наиболее высокие показатели продуктивности отмечали в группе, где в рацион цыплят не добавляли подсолнечный шрот.

2. Динамика показателей продуктивности у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в зависимости от структуры рациона ($X \pm x$, виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», 2015 год)

Показатель	I группа (контроль, $n = 35$)	II группа (опыт, $n = 35$)
Сохранность, %	100,0	97,1
Живая масса, г:		
1-суточные	44,00±0,20	44,00±0,17
21-суточные	870,00±20,40	875,00±19,75
36-суточные	2142,00±45,40	2017,00±53,30*
в том числе		
петушки	2380,00±34,42	2261,00±36,12*
курочки	1904,00±27,92	1773,00±34,17*
Среднесуточный прирост живой массы, г:		
с 1-х по 36-е сут	58,30±2,30	54,81±2,19*
за период опыта (22-36-е сут)	84,80±3,12	76,13±2,14*
Потреблено корма, кг:		
всего	3,44±0,15	3,69±0,12
за период опыта (22-36-е сут)	2,25±0,10	2,28±0,08
Затраты корма, кг:		
1-36-е сут	1,64±0,04	1,87±0,06*
22-36-е сут	1,77±0,07	2,00±0,10*

Примечание. I и II группа — соответственно основной рацион без включения подсолнечного шрота и с включением 25 % подсолнечного шрота при снижении количества обменной энергии на 4,88 Ккал/100 г и сырого протеина на 1,01 %.

* Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Итак, методами NGS-секвенирования и ПЦР-анализа впервые показано, что, вопреки традиционным взглядам, микробиоценоз слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров характеризовался богатой и разнообразной таксономической структурой и включал как облигатных представителей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) птицы (семейства *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, фила *Bacteroidetes*), так и ряд неидентифицированных таксонов. Классическим представлениям также противоречили полученные данные о том, что при этом энтерококки и бифидобактерии занимали в сообществе минорное положение, а типичные патогенные микроорганизмы ЖКТ птицы (*Camphylobacter* sp., *Staphylococcus* sp.) полностью отсутствовали. Введение в рацион цыплят 25 % подсолнечного шрота приводило к изменению численности и структуры микробиома слепых отростков кишечника и было связано с достоверным снижением продуктивных качеств птицы. Применение молекулярных методов (NGS-секвенирование и ПЦР в реальном времени) позволяет провести детальный анализ структуры микробной популяции, ее зависимости от режимов кормления и углубленно изучать микробиологию пищеварения, рассматривая ее как фактор устойчивости, жизнеспособности и продуктивности птицы.

¹ООО «Биотроф+»,

196602 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ул. Малиновская, 8, лит. А, 7-Н,

e-mail: ilina@biotrof.ru;

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский

и технологический институт птицеводства,

141300 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад-11,

ул. Птицеградская, 10,

e-mail: fisinin@vniitip.ru

Поступила в редакцию

24 июля 2015 года

AND INFLUENCED BY THE COMBINED FEED COMPOSITION AND DECREASED METABOLIZABLE ENERGY

L.A. Il'ina¹, E.A. Yildirim¹, I.N. Nikonov¹, V.A. Filippova¹, G.Yu. Laptev¹, N.I. Novikova¹,
A.A. Grozina², T.N. Lenkova², V.A. Manukyan², V.I. Fisinin², I.A. Egorov²

¹Biotrof+ Ltd, 7-N, 8, lit. A, Malinovskaya ul., St. Petersburg, 196602 Russia, e-mail ilina@biotrof.ru;

²All-Russian Research and Technological Poultry Institute, Federal Agency of Scientific Organizations, 10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad-11, Moscow Province, 141300 Russia, e-mail fisinin@vniitip.ru

Acknowledgements:

Supported by Russian Science Foundation, the project «Modern understanding of gut microflora in poultry depending on feed composition: molecular and genetic approach» № 14-16-00140

Received July 24, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2015.6.817eng

Abstract

Currently the processed sunflower products as the cheapest source of vegetable protein are considered an alternative to soybean cake and meal in the poultry diet. However, in sunflower meal the energy value is lower, lysine rate is less than required, and the level of non-starch polysaccharides not digestible in poultry gut because of absence of specific enzymes (i.e., amylases, cellulases, etc.) are rather high. Digestion of these components is possible due to microbial enzymes. Gut content is detained in the poultry caecum for the longest time, wherein the basic processes of microbial proteolysis, and cellulose and starch destruction are performed. Using modern molecular methods of NGS-sequence analysis and real-time PCR, we investigated the number of bacteria and the structure of bacterial community in cecum of 36-day-old Cobb 500 broiler chickens fed with diets containing soybean meal or sunflower meal. Contrary to traditional view, the composition of caecum microbiom was very abundant and divers, and included the obligate gut microflora (*Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroidetes*) and non-identified taxons. Moreover, the typical gut microorganisms (i.e., enterococcus, bifidobacterium) were minor and the pathogenic bacteria of genera *Camphylobacter* sp., *Staphylococcus* sp. were not detected. Our results first characterized in detail the caecum microbiome as influenced by the combined factors such as specific composition and decreased metabolizable energy in feed. This study showed that the feed containing 25 % sunflower meal caused a 14.7-fold increase in total number of bacteria while the number of phylum *Bacteroides* amylolytics was 1.4-times lower, the family *Clostridiaceae* was 1.2-times less abundant and the cellulolytic families *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* were 1.16-times and 1.48-times depressed, respectively, thus indicating limitations in the metabolism of hydrolysable components and cellulose in the poultry gut. Moreover, the obligate bacterial intestinal flora changed in number. Particularly, there were a 3.04-fold increase in genera *Lactobacillus* sp., a 1.5-fold increase in order *Bacillales*, 3-fold decrease in genera *Bifidobacterium* sp. and 10-fold decrease in genera *Enterococcus* sp. Also the bacterial number in genera *Escherichia* sp. was found to be 55-fold lower, and families *Sutterellaceae* and *Erysipelotrichaceae*, including species that might cause disbiotic diseases, were depressed 2.5 times and 1.8 times, respectively. Moreover, our research showed that the changes in the cecum bacterial community due to the sunflower meal containing feed depressed the chickens' performance. Thus, the weight of 36-day-old chickens (males and females) was the highest in the control group not fed with sunflower meal (2142.0±45.40 g) compared to the experimental poultry (2017.0±53.30 g) in which the feed consumption increased by 13 %.

Keywords: microflora of cecum, chicken, performance in broilers, bacterial community, NGS-sequencing, real-time PCR.

REFERENCES

1. Fisinin V.I., Egorov I.A., Okolelova T.M., Imangulov Sh.A. *Kormlenie sel'skokhozyaistvennoi ptitsy* [Feeding in poultry]. Sergiev Posad, 2001.
2. *Normy i ratsiony kormleniya sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh. Spravochnoe posobie* /Pod redaktsiei A.P. Kalashnikova, V.I. Fisinina, V.V. Shcheglova, N.I. Kleimenova [Feed norms and rations for farm animals: handbook. A.P. Kalashnikov, V.I. Fisinin, V.V. Shcheglov, N.I. Kleimenov (eds.)]. Moscow, 2003.
3. Timoshko M.A. *Mikroflora pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* [Microflora of gastrointestinal tract in farm animals]. Kishinev, 1990.
4. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* [Study of gastrointestinal microflora in farm animals and poultry]. Moscow, 2006.
5. Salanitro J., Fairchild I., Zgornicki Y. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl. Microbiol.*, 1974, 27: 678-687.
6. Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98: 4301-4309 (doi: 10.1007/s00253-014-5646-2).
7. Zdunczyk Z., Jankowski J., Kaczmarek S. Determinants and effects of postileal

- fermentation in broilers and turkeys part I: gut microbiota composition and its modulation by feed additives. *World's Poult. Sci. J.*, 2015, 71(1): 37-57 (doi: 10.1017/S0043933915000045).
8. Stanley D., Denman S.E., Hughes R.J., Geier M.S., Crowley T.M., Chen H. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 96: 1361-1369 (doi: 10.1007/s00253-011-3847-5).
 9. Torok V.A., Hughes R.J., Mikkelsen L.L. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiota in broiler chickens across various feeding trials. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(17): 5868-5878 (doi: 10.1128/AEM.00165-11).
 10. Barnes E. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *J. App. Bacteriol.*, 1979, 46: 407-419 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1979.tb00838.x).
 11. Mead G.C. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool.*, 1989, 3: 48-54 (doi: 10.1002/jez.1402520508).
 12. 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).
 13. Apajalahti J., Kettunen A., Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World Poult. Sci. J.*, 2004, 60: 223-232 (doi: 10.1079/WPS200415).
 14. Gong J., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Sabour P.M., Wheatcroft R., Chen S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 208: 1-7 (doi: 10.1016/S0378-1097(01)00521-3).
 15. Amit-Romach E., Sklan D., Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult. Sci.*, 2004, 83: 1093-1098 (doi: 10.1093/ps/83.7.1093).
 16. Diaz-Sanchez S., Hanning I., Pendleton S., D'Souza D. Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety. *Poult. Sci.*, 2013, 92: 562-572 (doi: 10.3382/ps.2012-02741).
 17. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473: 174-180 (doi: 10.1038/nature09944).
 18. Yatsunenkov T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 2012, 486: 222-227 (doi: 10.1038/nature11053).
 19. Qu A., Brulc J., Wilson M., Law B., Theoret J., Joens L. Comparative metagenomics reveals host specific metavirolomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS ONE*, 2008, 3: e2945 (doi: 10.1371/journal.pone.0002945).
 20. Mohd Shaufi M.A., Sieo C.C., Chong C.W., Gan H.M., Ho Y.W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathogens*, 2015, 7: 4-16 (doi: 10.1186/s13099-015-0051-7).
 21. Danzeisen J.L., Kim H.B., Isaacson R.E., Tu Z.J., Johnson T.J. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS ONE*, 2011, 6: e27949 (doi: 10.1371/journal.pone.0027949).
 22. Singh K., Shah T., Deshpande S., Jakhesara S., Koringa P., Rank D. High throughput put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, 39: 10595-10602 (doi: 10.1007/s11033-012-1947-7).
 23. Stanley D., Denman S.E., Hughes R.J., Geier M.S., Crowley T.M., Chen H. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 96: 1361-1369 (doi: 10.1007/s00253-011-3847-5).
 24. *Metodika provedeniya nauchnykh i proizvodstvennykh issledovaniy po kormleniyu sel'skokhozyaystvennoi ptitsy. Molekulyarno-geneticheskie metody opredeleniya mikroflory kishechnika* /Pod redaktsiei V.I. Fisinina [Scientific and practical study of feeding in poultry. Molecular genetic assay of gut microflora. V.I. Fisinin (ed.)]. Sergiev Posad, 2013.
 25. *Instruktsiya po sanitarno-mikrobiologicheskomu kontrolyu tushek, myasa ptitsy, ptitseproduktov, yaits i yaitseproduktov na ptitsevodcheskikh i pererabatyvayushchikh predpriyatiyakh* [Instruction for sanitary and microbiological control of carcasses, meat, products, eggs and egg products at poultry farms and processing enterprises]. Moscow, 1990.
 26. Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98: 4301-4310 (doi: 10.1007/s00253-014-5646-2).
 27. Rehman H., Vahjen W., Awad W., Zentek J. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.*, 2007, 61: 319-335 (doi: 10.1080/17450390701556817).
 28. Torok V., Allison G., Percy N., Ophel-Keller K., Hughes R. Influence of antimicrobial feed additives on broiler commensal posthatch gut microbiota development and performance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77: 3380-3390 (doi: 10.1128/AEM.02300-10).
 29. Redig P. The avian ceca: obligate combustion chambers or facultative afterburners? — The conditioning influence of diet. *J. Exp. Zool.*, 1989, 3: 66-69 (doi: 10.1002/jez.1402520511).