

**БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ШТАММА *Lactobacillus plantarum* L-211
ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА. Сообщение I. КОРМЛЕНИЕ БРОЙЛЕРОВ*****В.И. ФИСИНИН¹, Е.Н. АНДРИАНОВА¹, И.И. ЧЕБОТАРЕВ², Г.Ю. ЛАПТЕВ³,
И.Н. НИКОНОВ³, Л.А. ИЛЬИНА³, А.В. САВИНОВ², Н.Г. МАШЕНЦЕВА⁴,
Д.Л. КЛАБУКОВА⁴, Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ³, Н.И. НОВИКОВА³**

В кормлении птицы лизин относится к группе незаменимых лимитирующих аминокислот. Его дефицит в растительных кормах, особенно пшенично-ячменного и кукурузно-подсолнечного типа, может достигать 15-20 %. Дополнение рационов синтетическими аминокислотами часто негативно отражается на продуктивности птицы из-за возникновения их дисбаланса вследствие быстрого поступления в кровь. Проведенное исследование продолжает серию экспериментов по определению эффективности замены синтетического лизина в рационах птицы на микроорганизмы, синтезирующие L-лизин, выполненных во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте птицеводства. Предыдущие работы продемонстрировали высокий положительный эффект препарата Пролизэр-БиоР (ООО «Биореактор», г. Москва) на основе штамма — продуцента лизина *Escherichia coli*, однако важное значение имеет поиск аналогичных продуцентов среди непатогенной микрофлоры. В представленном исследовании нами определены возможности применения штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 (ООО «Биореактор, г. Москва) для оптимизации микрофлоры желудочно-кишечного тракта и повышения продуктивных показателей у птицы. Используя T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), мы сравнили бактериальные сообщества слепых отростков кишечника у четырех групп цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в возрасте 35 сут. Цыплята I группы (контроль) получали рассыпные сбалансированные комбикорма. В рацион птицы из II, III и IV групп дополнительно вводили препараты отечественного производства на основе микроорганизмов — продуцента лизина *Lactobacillus plantarum* L-211, а также штаммов *L. plantarum* и *Bacillus subtilis*, не продуцирующих лизин, из расчета 1 мл·гол.⁻¹·сут.⁻¹, бацилл — 2 мл·гол.⁻¹·сут.⁻¹. Содержание живых микроорганизмов в препаратах — 100 млн КОЕ/мл. Введение в рацион птицы продуцента лизина *L. plantarum* L-211 приводило к увеличению содержания лактобактерий в 3,88 раза ($P < 0,005$), целлюлозо- и амилитических бактерий класса *Clostridia* — в 1,13 раза и представителей порядка *Negativicutes*, утилизирующих кислоты, — в 1,36 раза ($P < 0,05$). Одновременно уменьшалась доля патогенных пептококков в 1,35 раза ($P < 0,05$), стафилококков в 1,46 раза и энтеробактерий в 2,33 раза ($P < 0,005$). Биопрепарат на основе *L. plantarum* L-211 не снижал содержания фузобактерий (в отличие от не синтезирующего лизин штамма лактобактерий) и количество кампилобактерий (в отличие от препарата на основе *B. subtilis*). В отношении пастерелл и актиномицетов *L. plantarum* L-211 был неэффективен (в сравнении с контролем их доля повышалась соответственно в 1,33 и 2,75 раза; $P < 0,005$). При применении препарата на основе продуцента лизина продемонстрированы наилучшие показатели средней живой массы птицы на 35-е сут выращивания и среднесуточного прироста, которые были выше по сравнению с контролем соответственно на 5,01 и 5,14 %. Доступность лизина у птицы при использовании *L. plantarum* L-211 была наименьшей.

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

Для обеспечения высокой продуктивности птицы необходимы полноценные и сбалансированные по всем питательным веществам комбикорма. Особое значение имеет лизин, который относится к группе незаменимых лимитирующих аминокислот. В растительных кормах он содержится в незначительных количествах, поэтому в рационах животных и птицы его часто не хватает, особенно при преимущественном использовании зерновых злаков, подсолнечного шрота и незначительной доле (1-2 %) животных кормов. В рационах пшенично-ячменного и кукурузно-подсолнечного типа дефицит лизина может достигать 15-20 %. Поэтому для балансирования рационов широко используют синтетический лизин (1-3).

Как известно, введение синтетических аминокислот в рацион сопряжено с неизбежным количественным ограничением: их быстрое всасы-

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

вание в кровь (в сравнении с аминокислотами, поступающими из растительных или животных кормов в процессе пищеварения) приводит к дисбалансу аминокислот в организме птицы и негативно отражается на продуктивности. Синтетический лизин в форме монохлоридрата приводит к избыточному содержанию хлора в комбикормах и, как следствие, к его дисбалансу, что также негативно влияет на продуктивность (4).

В настоящее время во многих странах в рационах птицы используют кормовые добавки на основе бактерий, продуцирующих аминокислоты и другие жизненно необходимые вещества (5-7). При изучении действия отечественного бактериального препарата Проллизэр-БиоР установлена эффективность замены синтетического лизина его продуцентом — штаммом *Escherichia coli* (8-10). Однако *E. coli* — представитель условно-патогенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта. У цыплят при ослаблении иммунитета кишечная палочка становится причиной колибактериоза (11-13). Несмотря на то, что в наших исследованиях с продуцентом лизина на основе непатогенного штамма *E. coli* не наблюдалось случаев колибактериоза (14), задача поиска продуцентов лизина на основе непатогенной микрофлоры, к которой относятся лактобактерии, не утрачивает актуальности.

Штамм *Lactobacillus plantarum* L-211 был идентифицирован до вида с помощью анализа генов 16S рПНК с гомологией 99 %. Фенотипически штамм *L. plantarum* L-211 — это мелкие неспорообразующие мезофильные факультативно-анаэробные грамположительные палочковидные бактерии. По биохимическим признакам микроорганизм каталазоотрицательный, не образующий CO₂ из глюкозы, сероводород и индол, разжижающий желатину, обладающий нитратредуктазной активностью, восстанавливающий лакмусовое молоко, гидролизующий L-аргинин и сбраживающий большинство углеводов. По технологическим свойствам *L. plantarum* L-211 имеет энергию кислотообразования за 24 ч 80 °Т, предел кислотообразования — 140 °Т (7 сут). Микроорганизм не декарбоксилирует аминокислоты, следовательно, не образует биогенных аминов — гистамина, тирамина, путресцина, кадаверина. *L. plantarum* L-211 способен продуцировать лизин (в среднем 148,4±4,45 мг/л) при культивировании в минеральной среде (14).

В представляемой работе мы впервые показали возможность оптимизировать микрофлору желудочно-кишечного тракта птицы и ее обеспеченность аминокислотами (в том числе лизином) при использовании биопрепарата на основе штамма *L. plantarum* L-211.

Нашей целью было изучение влияния продуцента лизина — штамма *L. plantarum* L-211 на состав бактериального сообщества кишечника и продуктивные показатели у цыплят-бройлеров.

Методика. Объектом исследования были четыре группы бройлеров (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500 (по 35 гол. в каждой) в период с 1- до 35-суточного возраста (виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», Московская обл.). Цыплят I группы (контроль) кормили рассыпными комбикормами, сбалансированными по всем питательным веществам (ОР) в соответствии с нормами Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства (ВНИТИП) (1). Птица во II группе получала ОР и пробиотик на основе штамма *L. plantarum* L-211 (ОО «Биореактор», г. Москва; 1 мл · гол.⁻¹ · сут⁻¹), в III группе — ОР с добавкой отечественного препарата на основе *L. plantarum* (1 мл · гол.⁻¹ · сут⁻¹), в IV — ОР и отечественный пробиотический препарат на основе *Bacillus subtilis* (2 мл · гол.⁻¹ · сут⁻¹). Для каждого из препаратов количество живых микроорганизмов — 100 млн КОЕ/мл. Цыплят содержали в клеточных батареях Avi-Max («Big Dutchman International GmbH», Германия) без разделения по полу,

с соблюдением технологических параметров согласно нормам ВНИТИП.

В период опыта учитывали основные зоотехнические показатели: живую массу птицы в 7-, 14-, 21-, 28-суточном возрасте и к окончанию выращивания (индивидуальное взвешивание поголовья), сохранность поголовья, среднесуточный прирост живой массы, потребление и затраты корма на 1 кг прироста живой массы. В физиологическом балансовом опыте на 35-суточных цыплятах-бройлерах определяли переваримость протеина, жира, использование азота, кальция, фосфора, доступность метионина и лизина (15, 16).

Содержимое слепых отростков кишечника для молекулярно-генетических исследований отбирали при убое птицы в 35-суточном возрасте со строгим соблюдением стерильности по установленным требованиям (16). Состав бактериального сообщества слепых отростков исследовали методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) (17, 18). Тотальную ДНК для T-RFLP анализа выделяли из образцов с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. ПЦП проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США), используя эубактериальные праймеры: 63F — CAGGCCTAACACATGCAAGTC с меткой на 5'-конце (флуорофор WellRed D4, «Beckman Coulter, Inc.», США) и 1492R — TACGGHTACCTTGTTA-CGACTT. Флуоресцентно меченные ампликоны ДНК гена 16S рРНК очищали по стандартной методике (18). Полученные ампликоны (30-50 нг) рестрицировали эндонуклеазами HaeIII, HhaI и MspI, следуя рекомендации изготовителя («Fermentas, Inc.», Литва). Продукты рестрикции исследовали с помощью системы генетического анализа SEQ™ 8000 («Beckman Coulter Inc.», США) согласно рекомендациям производителя. Для определения филогенетической принадлежности бактерий применяли программу Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью дисперсионного анализа в программе Microsoft Excel 2010. Рассчитывали средние (\bar{X}) и ошибки средних (x). Различия с контролем считали значимыми при $P < 0,05$; $P < 0,01$ и $P < 0,005$.

Результаты. Кормление цыплят осуществляли вручную, вволю, сухими полнорационными комбикормами в соответствии с нормами для кросса по ОР согласно нормам ВНИТИП (табл. 1).

1. Рецепты экспериментальных комбикормов (основной рацион) для цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 разного возраста

Компонент, %	Период выращивания	
	1-21-е сут	22-35-е сут
Пшеница	42,57	55,20
Кукуруза	10,00	0
Жмых подсолнечный кормовой (содержание протеина 34 %)	9,86	7,18
Соевое масло	2,65	5,00
Холинхлорид	0,07	0,07
Соя полножирная кормовая (содержание протеина 34 %)	25,00	23,94
Рыбная мука кормовая (содержание протеина 65 %)	7,00	6,00
Метионин кормовой (не менее 99 %)	0,27	0,23
Лизин кормовой (не менее 78 %)	0,41	0,27
Монокальцийфосфат кормовой	0,47	0,59
Известняк	1,36	1,13
NaCl	0,24	0,29
Премикс (ВНИТИП, Россия)	0,10	0,10
Всего содержание в 100 г комбикорма, %:		
сухое вещество	86,45	84,30
обменная энергия, ккал	310	320
сырой протеин	22,50	21,00
жир	9,82	11,46
линолевая кислота	4,68	5,52
сырая клетчатка	5,05	4,63
лизин	1,45	1,25

метионин	0,66	0,58
метионин + цистин	0,99	0,89
треонин	0,80	0,74
триптофан	0,26	0,25
Ca	1,00	0,89
P	0,68	0,67
P усвояемый	0,39	0,39
Na	0,20	0,20
K	0,72	0,69
Cl	0,34	0,33
холин	0,05	0,05

По результатам T-RFLP-анализа (табл. 2), у бройлеров из всех групп идентифицировали микроорганизмы 5 филумов, включая *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*, что согласуется с исследованиями микробиома содержимого слепых отростков, проведенными ранее (19-21). Доминирующими в исследуемых микробных сообществах были представители филума *Firmicutes*, включающего преимущественно бактерии с целлюлозо- и амилитическими свойствами из класса *Clostridia* (в том числе семейств *Ruminococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae* и др.), микроорганизмы порядка *Negativicutes*, утилизирующие кислоты, а также бактерии семейств *Bacillaceae* и *Lactobacillaceae*. Бактерии других филумов присутствовали в меньших количествах.

Среди условно-патогенных и патогенных микроорганизмов у исследуемых цыплят обнаружили бактерии из семейств *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Actinobacteriaceae*, филы *Fusobacteria*, а также родов *Peptococcus* и *Staphylococcus*.

2. Соотношение бактериальных таксонов (%) в слепых отростках кишечника у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в возрасте 35 сут при введении в рацион препаратов пробиотиков ($X \pm x$, виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», Московская обл.)

Таксон	I группа (контроль, n = 3)	II группа (n = 3)	III группа (n = 3)	IV группа (n = 3)
Фила <i>Bacteroidetes</i>	2,04±0,10	3,01±0,12**	2,76±0,14*	2,65±0,10*
Фила <i>Firmicutes</i>	53,71±2,43	60,17±2,84	43,28±2,11*	63,80±3,01
класс <i>Clostridia</i>	31,14±1,15	35,08±1,26	21,74±1,01**	40,14±1,98*
род <i>Peptococcus</i>	2,36±0,14	1,75±0,05*	1,27±0,07**	1,94±0,08
род <i>Lactobacillus</i>	1,72±0,08	6,63±0,31***	11,00±0,49***	10,60±0,60***
род <i>Bacillus</i>	10,60±0,43	6,45±0,23**	4,40±0,21***	3,34±0,14***
род <i>Staphylococcus</i>	0,67±0,23	0,46±0,21	0,38±0,14	0,26±0,11
порядок <i>Negativicutes</i>	7,22±0,29	9,80±0,42*	4,49±0,19**	7,52±0,39
Фила <i>Actinobacteria</i>	2,82±0,13	7,76±0,30***	2,43±0,12	6,11±0,30***
семейство <i>Bifidobacteriaceae</i>	0,12±0,01	Н.п.д.о.	0,07±0,01*	0,04±0,01**
Фила <i>Proteobacteria</i>	29,29±1,14	13,40±0,59**	25,47±1,02	15,06±0,62***
семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	14,10±0,65	6,04±0,29***	15,70±0,78	1,07±0,04***
семейство <i>Campylobacteriaceae</i>	2,08±0,09	2,23±0,06	1,92±0,08	1,47±0,06**
семейство <i>Pseudomonadaceae</i>	9,43±0,58	1,71±0,05***	5,12±0,09**	8,12±0,27
семейство <i>Pasteurellaceae</i>	1,32±0,22	1,76±0,11	1,46±0,12	2,46±0,42
Фила <i>Fusobacteria</i>	2,58±0,14	2,52±0,12	1,56±0,10**	2,18±0,17
Неклассифицированные последовательности	9,56±0,59	13,05±0,65	24,50±1,21***	10,20±0,52

Примечание. Во II, III и IV группах к основному (контрольному) рациону добавляли препараты пробиотиков на основе соответственно *Lactobacillus plantarum* L-211, *L. plantarum* и *Bacillus subtilis* (подробнее 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 $P < 0,005$.

Мы установили, что введение в рацион бройлеров живых культур пробиотических бактерий приводило к изменению количества выявленных таксонов в содержимом слепых отростков, которое имело сходные тенденции для птицы из опытных групп. Так, у цыплят, в рацион которых вводились пробиотики, доля бактерий рода *Lactobacillus*, обладающих, как правило, значительными антагонистическими свойствами против патогенных

видов благодаря синтезу антимикробных соединений (22, 23), существенно повышалась: в 3,88 ($P < 0,005$), 6,40 ($P < 0,005$) и 6,12 раза ($P < 0,005$) соответственно для II, III и IV групп по сравнению с контролем. Содержание других бактерий, имеющих сходные свойства в отношении патогенов, — бацилл у птицы во всех группах по сравнению с контролем снижалось соответственно в 1,13 ($P < 0,01$), 1,43 ($P < 0,005$) и 1,29 ($P < 0,005$) раза. Кроме того, у бройлеров из этих групп численность бактерий филы *Bacteroidetes*, связанных с процессами ферментации углеводов корма вследствие способности продуцировать амилолитические и целлюлозолитические ферменты, по группам повышалась относительно контроля в 1,48 ($P < 0,01$), 1,35 ($P < 0,05$) и 1,30 ($P < 0,05$) раза.

Однако в отношении других бактерий, также обладающих амило- и целлюлозолитическими свойствами (класс *Clostridia*), действие изучаемых препаратов было неодинаковым. Включение в рацион продуцента лизина *L. plantarum* L-211 и *B. subtilis* способствовало повышению доли бактерий из класса *Clostridia* соответственно в 1,13 и 1,29 ($P < 0,05$) раза, тогда как скормливание *L. plantarum*, не продуцирующего лизин, напротив, снижало этот показатель в 1,43 раза ($P < 0,01$) по сравнению с контролем. Эффект препарата на основе *L. plantarum* L-211 в отношении представителей класса *Clostridia* согласуется с данными зарубежных авторов, которые показали, что недостаток лизина в рационах птицы приводит к сокращению представленности рода *Eubacterium* в слепых отростках кишечника (24).

Аналогичную тенденцию отмечали в отношении бактерий из порядка *Negativicutes*, утилизирующих кислоты. Введение в рационы продуцента лизина приводило к росту их доли в 1,36 раза ($P < 0,05$), тогда как препарата на основе не синтезирующего лизин штамма лактобактерий — к ее уменьшению в 1,61 раза ($P < 0,01$) относительно контроля.

Следует отметить, что введение в рацион пробиотических препаратов способствовало снижению численности ряда патогенов в слепых отростках желудочно-кишечного тракта. Так, все препараты приводили к уменьшению доли патогенов, вызывающих гнойно-некротические инфекции у цыплят: пептококков — в 1,35 ($P < 0,05$), 1,86 ($P < 0,01$) и 1,22 раза, стафилококков — в 1,46; 1,76 и 2,58 раза соответственно во II, III и IV группах. Кроме того, продуцент лизина сократил содержание энтеробактерий, вызывающих гастроэнтериты у птицы, в 2,33 раза ($P < 0,005$) в сравнении с контролем. Эффективным в отношении энтеробактерий и кампилобактерий (возбудители гастроэнтерита), а также фузобактерий (возбудители гнойно-некротических инфекций у животных и птицы) оказался препарат *B. subtilis*, в результате применения которого численность указанных патогенов снизилась соответственно в 13,17 ($P < 0,005$), 1,41 ($P < 0,01$) и 1,18 раза по отношению к контролю. Пробиотик на основе не синтезирующих лизин лактобактерий был эффективен в отношении фузобактерий, доля которых снижалась в 1,65 раз ($P < 0,01$) по сравнению с контролем.

В то же время в отношении некоторых патогенов пробиотического эффекта от применения препаратов не наблюдали. Так, у цыплят из II и IV групп отмечалась тенденция к повышению доли пастерелл (вызывают респираторные инфекции у цыплят) соответственно в 1,33 и 1,76 раза, а также нежелательных актиномицетов (некоторые представители могут быть причиной актиномикозов) — в 2,75 ($P < 0,005$) и 2,16 раза ($P < 0,005$).

Интересен тот факт, что при применении пробиотических препаратов содержание представителей семейства *Pseudomonadaceae*, которые относятся к транзитным микроорганизмам, поступающим в организм с кормом, снижалось в слепых отростках кишечника бройлеров в 5,51 ($P < 0,005$); 1,84

($P < 0,01$) и 1,16 раза, а неидентифицированных таксонов — возростало в 1,25; 2,18 ($P < 0,005$) и 1,08 раза соответственно во II, III и IV группах.

3. Основные зоотехнические показатели у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в возрасте 35 сут при введении в рацион препаратов пробиотиков ($X \pm x$, виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», Московская обл.)

Показатель	I группа (контроль, $n = 3$)	II группа ($n = 3$)	III группа ($n = 3$)	IV группа ($n = 3$)
Сохранность поголовья, %	97,1	94,3	100	97,1
Живая масса в разном возрасте, г:				
1 сут	40,0±1,98	40,0±2,18	40,00±2,14	40,00±1,16
7 сут	120,22±2,88	112,22±3,25	117,44±2,77	114,22±2,84
14 сут	323,21±7,90	315,24±7,54	323,45±8,39	309,63±8,50
21 сут	708,42±13,72	668,42±14,44	698,16±14,95	671,58±14,35
28 сут	1128,0±36,89	1054,57±22,2	1110,14±38,30	1142,57±26,60
35 сут	1697,65±39,27	1739,68±33,17	1691,33±32,38	1687,20±39,85
в том числе у петушков	1882,50±38,97	1947,0±42,84	1900,0±26,42	1927,501±37,17
в том числе у курочек	1533,34±32,98	1640,95±23,06*	1587,0±22,74	1574,2±26,86
в среднем	1707,92±35,16	1793,5±33,19	1743,5±25,81	1750,85±31,45
Затраты корма на 1 гол., кг	2,748	2,779	2,681	2,635
Затраты корма на 1 кг прироста, кг	1,657	1,635	1,624	1,599
Среднесуточный прирост, г	49,05	51,57	50,10	50,32

Примечание. Во II, III и IV группах к основному (контрольному) рациону добавляли препараты пробиотиков на основе соответственно *Lactobacillus plantarum* L-211, *L. plantarum* и *Bacillus subtilis* (подробнее см. в разделе «Методика»).

* Различия с контролем статистически значимы при $P < 0,05$.

Сохранность птицы (табл. 3) варьировала (с разницей 3,7 %) в зависимости от применяемого препарата и оказалась наибольшей в III группе, где этот показатель был на 2,9 % выше, чем в контроле и в IV группе, и на 5,7 % выше, чем в III группе. Динамика живой массы также различалась в зависимости от группы: до 28-суточного возраста наибольшую имели бройлеры из I группы (контроль), на 35-е сут — из II группы, где в рацион вводили продуцент лизина *L. plantarum* L-211. Средняя живая масса цыплят II группы в сравнении с контролем была выше на 5,01 %, петушки по живой массе превосходили контрольных аналогов на 3,4 %, курочки — на 7,0 % ($P < 0,05$). При этом затраты корма на 1 кг прироста живой массы во II группе снижались и составили 1,635 кг против 1,657 кг в контроле. Возможно, более низкие зоотехнические показатели по живой массе у цыплят из II опытной группы в первый период выращивания связаны с применением препарата на фоне нормативного содержания лизина в рационе, что требует дополнительных исследований по корректировке дозировок.

Необходимо отметить некоторое отставание по живой массе в III группе, получавшей не синтезирующий лизин штамм *L. plantarum*, относительно контрольной птицы, которое наблюдали в первый период откорма, что связано прежде всего с большим числом курочек в группе. Во второй период средняя живая масса бройлеров в III группе превышала аналогичный показатель в контроле на 2,08 % (для петушков и курочек — соответственно на 0,93 и 3,50 %). При этом затраты корма на 1 кг прироста живой массы были ниже контрольных на 1,99 %.

В IV группе, где дополнительно к ОР скармливали препарат *B. subtilis*, скорость роста цыплят к 28-м сут выращивания оказалась выше, по живой массе они превосходили I группу (превышение контрольных значений на 1,30 %, к концу откорма — на 2,51 %). Введение в рацион препарата на основе *B. subtilis* также позволило получить самые низкие затраты корма на 1 кг прироста живой массы — 1,599 кг против 1,657 кг в I группе.

Результаты физиологического (балансового) опыта (табл. 4) в целом согласовывались с данными по продуктивности бройлеров. Так, во всех опытных группах переваримость сухого вещества корма и питательных веществ рациона имела тенденцию к снижению по сравнению с контролем. Мы отмечали более низкую переваримость протеина, сухого вещества корма, жира и использование азота у цыплят из II-IV групп, что ука-

зывает на необходимость скорректировать способ применения и дозировки пробиотиков (например, использовать режим прерывистой выпойки). Отметим, что применение в рационе бройлеров III группы не синтезирующего лизин штамма *L. plantarum* способствовало повышению перевариваемости клетчатки на 0,5 % по сравнению с контролем.

4. Использование питательных веществ корма (%) у цыплят-бройлеров кросса Cobb 500 в возрасте 35 сут при введении в рацион препаратов пробиотиков ($\bar{X} \pm x$, виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», Московская обл.)

Показатель	I группа (контроль, n = 3)	II группа (n = 3)	III группа (n = 3)	IV группа (n = 3)
Перевариваемость, %:				
протеина	94,7±1,12	92,20±1,32	93,90±0,98	93,10±1,19
сухого вещества корма	73,7±1,26	67,00±0,67	71,00±1,24	69,60±1,14
жира	83,2±1,01	80,20±1,85	81,30±2,13	80,10±0,95
клетчатки	29,5±1,14	21,00±0,96	30,00±1,43	24,40±1,32
Использование, %:				
азота	66,7±1,16	61,30±2,01	61,70±1,95	60,00±1,39
кальция	48,0±2,14	49,30±1,56	48,60±1,04	47,70±1,54
фосфора	44,9±1,75	47,90±1,22	44,50±2,01	42,80±1,95
Доступность, %:				
лизина	92,8±1,13	90,10±0,95	93,80±0,68	94,40±1,16
метионина	84,1±1,05	80,10±1,65	77,10±1,25	78,80±1,82

Примечание. Во II, III и IV группах к основному (контрольному) рациону добавляли препараты пробиотиков на основе соответственно *Lactobacillus plantarum* L-211, *L. plantarum* и *Bacillus subtilis* (подробнее см. в разделе «Методика»).

Более высокую доступность лизина отмечали у цыплят из III и IV опытных групп, которые получали препараты бактерий, не способных продуцировать лизин (93,8 и 94,4 % против 92,8 % в контроле).

Таким образом, применение в рационе птицы *L. plantarum* L-211 выражено влияет на бактериальное сообщество в слепых отростках кишечника. В отличие от двух других исследованных бактериальных препаратов штамм *L. plantarum* L-211 способствует одновременному росту доли целлюлозо- и амилотических бактерий класса *Clostridia* и бактерий порядка *Negativicutes*. Кроме того, он обладает пробиотической активностью, действуя положительно на численность лактобактерий и снижая представленность условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (включая пептококки, стафилококки, энтеробактерии). Следует отметить, что биопрепарат на основе *L. plantarum* L-211 не снижал содержания фузобактерий, которые подавлял не синтезирующий лизин штамм лактобактерий, а также кампилобактерии, против которых был эффективен препарат на основе *B. subtilis*. В отношении некоторых патогенов пробиотического эффекта от препаратов не отмечали. При этом применение *L. plantarum* L-211 приводило к повышению доли пастерелл и актиномицетов в сравнении с контролем.

Итак, наши исследования подтвердили возможность применения пробиотика на основе штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 для улучшения продуктивности бройлеров. Препарат на основе продуцента лизина продемонстрировал наилучшие результаты по средней живой массе на 35-е сут выращивания и среднесуточному приросту у цыплят. При этом у птицы, получавшей препараты, не обладающие способностью к синтезу лизина, его доступность была выше. Влияние изученных пробиотиков на состав сообщества патогенных, условно-патогенных, транзитных микроорганизмов и актиномицетов в слепых отростках кишечника бройлеров различалось в зависимости от бактериального препарата и периода выращивания, что указывает на возможность повысить эффективность пробиотических добавок за счет корректировки режимов и доз их введения в рацион.

¹ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН, 141311 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, 10, e-mail: eandrianova.andrianova@yandex.ru, olga@vnitip.ru;

Поступила в редакцию
3 октября 2016 года

²ООО «Биореактор»,

114142 Россия, Московская обл., г. Шелково, ул. Комарова, 18;
³ООО «Биотроф»,
192288 Россия, г. Санкт-Петербург, а/я 183,
e-mail: nikonov@biotrof.ru;
⁴ФГБОУ ВО Московский государственный университет
пищевых производств,
125080 Россия, г. Москва, Волоколамское ш., 11

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 382-390

DIETARY PROBIOTIC *Lactobacillus plantarum* L-211 FOR FARM ANIMALS. I. THE ADDITIVE FOR BROILER CHICKS (*Gallus gallus* L.)

V.I. Fisinin¹, E.N. Andrianova¹, I.I. Chebotarev², G.Yu. Laptev³, I.N. Nikonov³,
L.A. Il'ina³, A.V. Savinov², N.G. Mashentseva⁴, D.L. Klubukova⁴, E.A. Yildirim³,
N.I. Novikova³

¹Federal Scientific Center All-Russian Research and Technological Poultry Institute RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, 10, ul. Ptitsogradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia, e-mail eandrianova.andrianova@yandex.ru, olga@vnitip.ru;

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

³JSC «Biotrof», Kolpino, St. Petersburg, 192288 Russia, e-mail nikonov@biotrof.ru (corresponding author);

⁴Moscow 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.2017.2.382eng

Abstract

Lysine is an essential limiting amino acid in chick feeding. Its deficiency in feeds, especially of wheat-barley or corn-sunflower type, can reach 15-20 %. Dietary synthetic amino acids may negatively influence productivity due to imbalances caused by rapid amino acids entry into blood. This study continues a series of our experiments aimed at determining the efficiency of dietary synthetic lysine replacement by the microorganisms that synthesize L-lysine. Previous studies have shown a high positive effect of lysine producing *Escherichia coli* (Prolizer-BioR probiotic; JSC «Bioreactor», Moscow), however, seeking for similar producers among non-pathogenic microorganisms remains important. In this paper we present the findings in the support of *Lactobacillus plantarum* L-211 probiotic (JSC «Bioreactor», Moscow) ability to optimize the gut microflora in view to increase the productive performance in poultry. Using the T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), we compared the cecal bacterial community in four groups of Cobb 500 broiler chickens at 35 days of age. The diet in group 1 (control) was a balanced combined feed. The broilers of groups 2, 3 and 4 were fed with dietary domestic probiotics containing lysine-producing *Lactobacillus plantarum* L-211, *L. plantarum* which does not produce lysine, or *Bacillus subtilis* (a daily rate of 1 ml for lactobacilli and 2 ml for bacilli). The concentration of all live bacteria was 100 million CFU/ml. Lysine producing *L. plantarum* L-211 increased the level of lactobacilli by 3.88 times ($P < 0.005$), of cellulolytic and amylolytic *Clostridia* by 1.13 times, and of acid utilizing *Negativicutes* by 1.36 times ($P < 0.05$), whereas, on the contrary, reduced the portion of pathogenic peptococci by 1.35 times ($P < 0.05$), staphylococci by 1.46 times and enterobacteria by 2.33 times ($P < 0.005$). However, *L. plantarum* L-211, unlike *L. plantarum* or *B. subtilis*, did not affect the *Fusobacteria* or *Enterobacteriaceae* counts. Also, *L. plantarum* L-211 was not effective against *Pasteurella* and actinomycetes which, on the contrary, increased in number 1.33- and 2.75-fold ($P < 0.005$) as compared to the control. The lysine-producing probiotic strain resulted in the highest average live weight in broilers at day 35 and the highest average daily weigh gain (5.01 % and 5.14 %, respectively). *L. plantarum* L-211 also led to the lowest availability of lysine in the diet.

Keywords: lysine, gut microflora, broilers, bacterial community, T-RFLP, probiotics, *Lactobacillus plantarum*, productivity, broiler chicken survival rates, feed conversion ratio.

REFERENCES

1. *Normy i ratsiony kormleniya sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh. Spravochnoe posobie* /Pod redaktsiei A.P. Kalashnikova, V.I. Fisinina, V.V. Shcheglova, N.I. Kleimenova [Norms and rations of feeding of farm animals. Reference Manual. A.P. Kalashnikov, V.I. Fisinin, V.V. Shcheglov, N.I. Kleimenov (eds.)]. Moscow, 2003 (in Russ.).
2. Panda A.K., Rao S.V., Raju M.V., Niranjan M., Reddy M.R. Effect of nutrient density on production performance, egg quality and humoral immune response of brown laying (Dahlem Red) hens in the tropics. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2012, 44(2): 293-299 (doi:

- 10.1007/s11250-011-0017-9).
3. Ospina-Rojas I.C., Murakami A.E., Eyng C., Nunes R.V., Duarte C.R., Vargas M.D. Commercially available amino acid supplementation of low-protein diets for broiler chickens with different ratios of digestible glycine + serine:lysine. *Poultry Sci.*, 2012, 91(12): 3148-3155 (doi: 10.3382/ps.2012-02470).
 4. Wecke C., Liebert F. Improving the reliability of optimal in-feed amino acid ratios based on individual amino acid efficiency data from n balance studies in growing chicken. *Animals (Basel)*, 2013, 3(3): 558-573 (doi: 10.3390/ani3030558).
 5. Alhotan R.A., Pesti G.M. Quantitative estimates of the optimal balance between digestible lysine and the true protein contents of broiler feeds. *Brit. Poultry Sci.*, 2016, 57(4): 538-550 (doi: 10.1080/00071668.2016.1180666).
 6. Kabisov R., Tsugkiev B., Khoziev A. *Ptitsevodstvo*, 2010, 5: 40-41 (in Russ.).
 7. Sakomura N.K., Ekmay R.D., Mei S.J., Coon C.N. Lysine, methionine, phenylalanine, arginine, valine, isoleucine, leucine, and threonine maintenance requirements of broiler breeders. *Poultry Sci.*, 2015, 94(11): 2715-2721 (doi: 10.3382/ps/pev287).
 8. Chebotarev I.I., Ernst L.K., Samuilenko A.Ya., Fisinin V.I., Panin A.N., Laptev G.Yu., Shkol'nikov E.E. *Shtamm Escherichia coli — produtsent lizina, sposob polucheniya kormovoi dobavki, sodержashchei dannyi shtamm, kompozitsiya, poluchennaya etim sposobom, i sposob kormleniya monogastrichnykh zhivotnykh i ptits. Patent RU 2 347 807 C1* [*Escherichia coli* strain, the lysine producer, a method for producing a feed additive containing the strain, a composition obtained by this method, and a method for feeding monogastric animals and birds. Patent RU 2 347 807 C1]. Appl. December 13, 2007. Publ. February 27, 2009, Bul. № 6 (in Russ.).
 9. Livshits V.A., Doroshenko V.G., Mashko S.V., Akhverdyan V.Z., Kozlov Yu.I. *Shtamm Escherichia coli — produtsent aminokisloty (varianty) i sposob polucheniya aminokislot (varianty). Patent RU 2212447 C2* [*Escherichia coli* strain, the amino acid producer (variants), and a method for producing amino acids (variants). Patent RU 2212447 C2]. Appl. April 26, 2000. Publ. September 20, 2003 (in Russ.).
 10. Ernst L.K., Laptev G.Yu. *Ispol'zovanie rekombinantnykh i nerekombinantnykh mikroorganizmov dlya optimizatsii mikroflory zheludochno-kishechnogo trakta sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh* [Recombinant and non-recombinant microorganisms for gut microbiota optimization]. Moscow, 2002 (in Russ.).
 11. Ernst L.K., Samuilenko A.Ya. *Enterobakterii v zhivotnovodstve* [Enterobacteria in animal husbandry]. Moscow, 2011 (in Russ.).
 12. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh i ptitsy* [Methods for studying the microflora of the digestive tract in agricultural animals and poultry]. Moscow, 2006 (in Russ.).
 13. Chen Y., Sun J., Liao X.P., Shao Y., Li L., Fang L.X., Liu Y.H. Impact of enrofloxacin and florfenicol therapy on the spread of OqxAB gene and intestinal microbiota in chickens. *Vet. Microbiol.*, 2016, 192: 1-9 (doi: 10.1016/j.vetmic.2016.05.014).
 14. Fisinin V.I., Chebotarev I.I., Nikonov I.N., Il'ina L.A., Laptev G.Yu., Mashentseva N.G. *Biofarmatsevticheskii zhurnal*, 2014, 6(6): 60-64 (in Russ.).
 15. Laptev G.Yu., Novikova N.I., Il'ina L.A., Ilydyrym E.A., Nagornova K.V., Dumova V.A., Soldatova V.V., Bol'shakov V.N., Gorfunkel' E.P., Dubrovina E.G., Sokolova O.N., Nikonov I.N., Lebedev A.A. *Normy sodержaniya mikroflory v rubtse krupnogo rogatogo skota* [Norms of rumen microflora in cattle]. St. Petersburg, 2014 (in Russ.).
 16. *Metodika provedeniya nauchnykh i proizvodstvennykh issledovaniy po kormleniyu sel'skokhozyaystvennoi ptitsy. Molekulyarno-geneticheskie metody opredeleniya mikroflory kishechnika* /Pod redaktsiei V.I. Fisinini [Methods of laboratory and field study on feeding of poultry. Molecular genetic methods for determining intestinal microflora. V.I. Fisinin (ed.)]. Sergiev Posad, 2013 (in Russ.).
 17. Bryukhanov A.L., Rybak K.V., Netrusov A.I. *Molekulyarnaya mikrobiologiya* [Molecular microbiology]. Moscow, 2012 (in Russ.).
 18. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, 1982.
 19. McCartney A.L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br. J. Nutr.*, 2002, 88: 29-37.
 20. Kitts C.L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2001, 2: 17-25.
 21. Il'ina L.A., Yildirim E.A., Nikonov I.N., Filippova V.A., Laptev G.Yu., Novikova N.I., Grozina A.A., Lenkova T.N., Manukyan V.A., Fisinin V.I., Egorov I.A. Taxons of chicken cecum microbiom are abundant, and influenced by the combined feed composition and decreased metabolizable energy. *Agricultural Biology*, 2015, 50(6): 817-824 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.817eng) (in Engl.).
 22. Kucan 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.
 23. Ouwehand A.C., Salminen S., Isolaury E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Leewenhoek*, 2002, 82: 279-289.
 24. Takahashi M., Kametaka M., Mitsuoka T. Influence of diets low in protein or lysine on the intestinal flora of chicks with reference to cecal contents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1982, 28(5): 501-510.