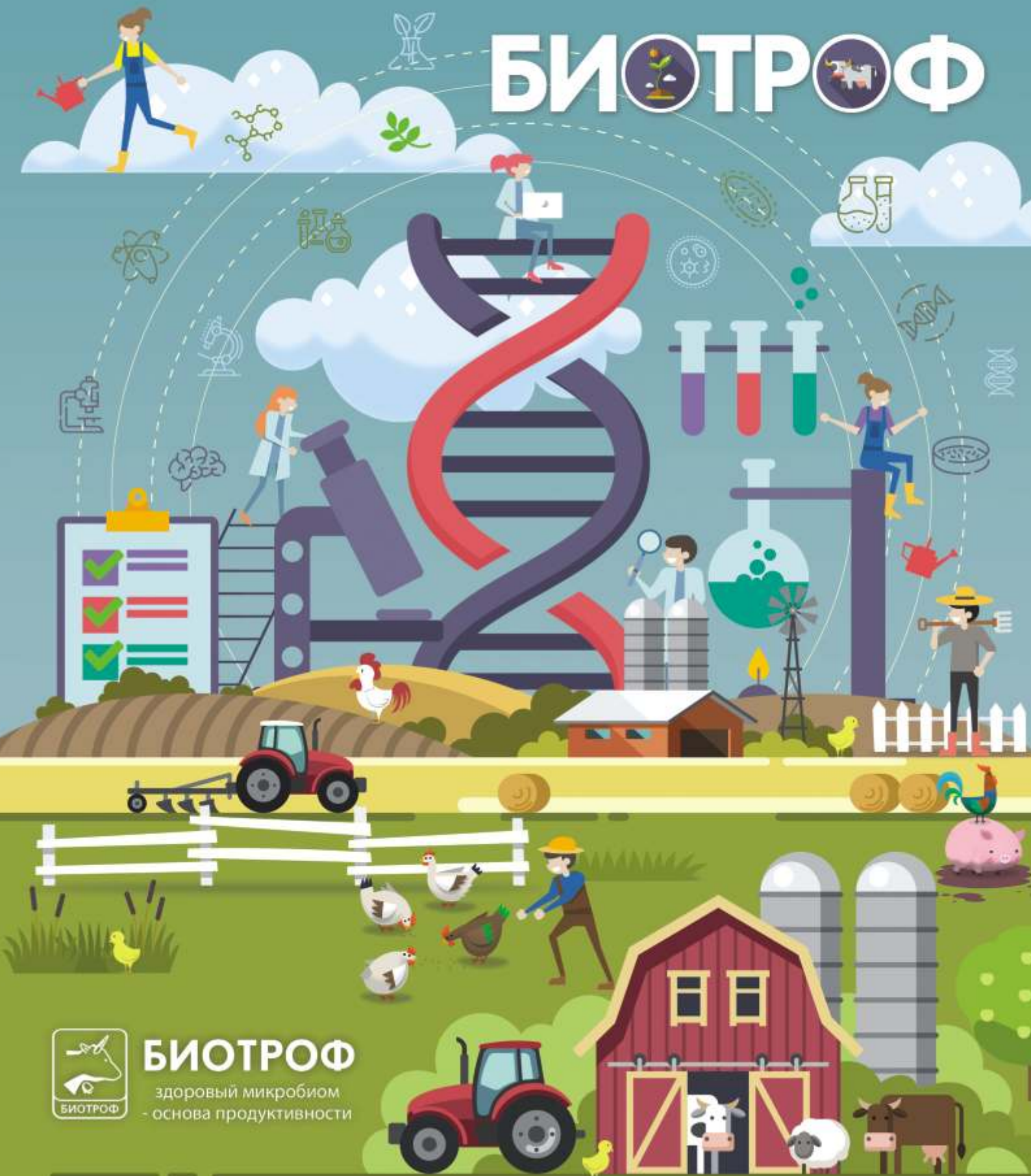


# РЕДАКТИРУЕМ МИКРОБИОМ

## БИОТРОФ



**БИОТРОФ**

здоровый микробиом  
- основа продуктивности

# Фитобиотик на защите иммунитета птицы

Лаптев Г.Ю., доктор биологических наук, директор

Ильина Л.А., кандидат биологических наук, начальник лаборатории

Йылдырым Е.А., кандидат биологических наук, биотехнолог

Филиппова В.А., биотехнолог

Дубровин А.В., аспирант, биотехнолог ООО «БИОТРОФ» (Санкт-Петербург)

Новикова О.Б., кандидат ветеринарных наук, заведующая отделом Всероссийский

научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (Санкт-Петербург, Ломоносов)

Кочиш И.И., доктор сельскохозяйственных наук, проректор ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина (Москва)

**Аннотация:** Приведены результаты исследования влияния кормовой добавки на основе эфирных масел Интебио® (ООО «БИОТРОФ») на показатели продуктивности, а также уровень иммунитета и баланс микрофлоры цыплят-бройлеров кросса Росс-308. Был поставлен опыт в условиях вивария ВНИВИП на 2 группах цыплят-бройлеров по 20 голов в каждой с применением данной кормовой добавки, а также с последующим экспериментальным заражением половины каждой группы в 19 дней жизни эпизоотическим штаммом *Salmonella enteritidis*. Живая масса в 20 дней жизни у цыплят опытной группы составила  $743 \pm 54$  г, а у контрольных  $650 \pm 104$  г; к концу опыта (42 дня) наивысшая средняя живая масса была в интактной подгруппе опытной группы. Заражение *S. enteritidis* привело к значительному снижению биоразнообразия микрофлоры кишечника в контрольной группе: среднее количество выявленных методом T-RFLP флотипов бактерий в инфицированной подгруппе составило 19,3 ( $p \leq 0,05$ ), тогда как в интактной подгруппе их число оказалось более чем в 2 раза выше. В зараженной подгруппе опытной группы количество детектированных флотипов составило 75 ( $p \leq 0,05$ ). Добавка Интебио® способствовала увеличению экспрессии генов интерлейкинов в опытной группе, как в инфицированной (в 4-6 раз), так и в интактной (в 3,5-5,0 раз) подгруппах; через 3 недели после заражения наблюдалось выравнивание показателей экспрессии генов в разных группах. Сделан вывод, что добавление в рацион цыплят-бройлеров Интебио® положительно влияет на прирост массы тела бройлеров, микрофлору кишечника и иммунный статус.

**Ключевые слова:** цыплята-бройлеры, эфирные масла, микрофлора, экспрессия генов, T-RFLP, ПЦП в реальном времени.

**Введение.** Здоровье и продуктивность птицы во многом зависят от состояния пищеварительной системы, у которой одним из основных показателей нормального состояния является баланс заселяющей ее микрофлоры. У птиц наиболее многочисленна и

разнообразна микрофлора слепых отростков кишечника - количество бактерий в них достигает  $10^{11}$  КОЕ/г [3]. Доказано, что нормальная микрофлора кишечника стимулирует развитие тканей слепых отростков и лимфатических образований желудочно-кишеч-

ного тракта.

Для подавления патогенных микроорганизмов в птицеводстве применяют кормовые антибиотики, подкислители и другие кормовые добавки, но зачастую они негативно влияют на микрофлору [1,2] и могут индуцировать у бактерий





повышение антибиотикорезистентности, что является одной из главных проблем современного сельского хозяйства и медицины.

Интебио® - это натуральный заменитель кормовых антибиотиков на основе смеси эфирных масел, разработанный в компании ООО «БИОТРОФ» для широкого применения как в птицеводстве, так и в животноводстве. Обладает antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity. Применение в птицеводстве позволяет снизить или даже полностью исключить использование антибиотиков. Масла, входящие в состав кормовой добавки, препятствуют возникновению респираторных заболеваний, уменьшают падеж птицы.

Цель работы - изучить влияние кормовой добавки Интебио® на основе смеси эфирных масел на здоровье и продуктивность цыплят-бройлеров.

**Материал и методика исследований.** Экспериментальную часть работы провели в виварии ВНИВИП на 40 бройлерах кросса Росс-308. Сразу после вывода их разделили на 2 равные группы - контрольную и опытную, по 20 голов в каждой. Цыплята опытной группы с первого дня жизни получали препарат Интебио®, который добавляли в комбикорм из расчета 80-120 г/т. За ними вели наблюдение в течение 42

дней, раз в неделю птицу взвешивали. В возрасте 19 дней половину цыплят каждой группы (по 10 голов) экспериментально заразили эпизоотическим штаммом *Salmonella enteritidis* в дозе  $5 \times 10^8$  КОЕ подкожной инъекцией в область верхней трети шеи. Через сутки после заражения, а также по достижении птицей 42-суточного возраста провели отбор проб содержимого кишечника для анализа микрофлоры и тканей слепых отростков ( $n=3$ ) для определения экспрессии генов. *Salmonella enteritidis* использовали в работе, исходя из информации Россельхознадзора о том, что сальмонеллез является одной из наиболее частых инфекционных болезней домашней птицы [5,6].

Взятые образцы биологического материала тестировали в лаборатории молекулярно-генетических исследований компании ООО «БИОТРОФ». Для оценки состава микрофлоры пользовались методом T-RFLP (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) [4]. Из содержимого слепых отростков выделяли пул ДНК микроорганизмов, проводили ДНК-амплификацию фрагмента гена 16S рНК с помощью эубактериальных праймеров 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце и 1492R (TACGGHTACCTTGTACGACTT), очищали флуоресцентно-меченые

ампликоны гена 16S рНК с помощью 3M раствора гуанидин-изотиоционата по стандартной методике, осуществляли рестрикцию ДНК рестриктазами HaeIII, HhaI и MspI с последующим анализом на секвенаторе CEQ 8000. По результатам вычисления размеров пиков и их площади в программе Fragment Analysis выделяли подтипы (филотипы) с погрешностью в 1 нуклеотид и определяли их относительное содержание в микробиоте. Принадлежность бактерий к определенным таксономическим группам устанавливали с помощью программы Fragment Sorter.

Из ткани слепых отростков выделяли тотальную РНК, которую использовали в реакции обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК. Экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе, выявляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением праймеров, представленных в табл. 1. Уровни относительной экспрессии генов рассчитывали методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [8].

**Результаты исследований и их обсуждение.** В начале эксперимента средняя масса тела цыплят обеих групп была равной и составляла 38 г. К 20-дневному возрасту (спустя сутки после заражения) масса цыплят, получавших кормовую добавку Интебио®, составила  $743 \pm 54$  г, а у контроль-

**Таблица 1. Праймеры для оценки экспрессии генов**

Ген	Праймеры
<b>Бета-дефензины</b>	
AvBD-10	F: GCTCTTCGCTGTTCTCCTCT R: CCCAGAGATGGTGAAGGTG
AvBD-11	F: ACTGCATCCGTTCCAAAGTCTG R: GTCCAGCTGTTCTCCAG
AvBD9	F: AACACCGTCAGGCATCTTCACA R: CGTCTTCTTGCTGTAAGCTGGA
<b>Цитокины</b>	
IL6	F: AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R: TTGGCAGGTTGAGGTTGTT
IL8L2	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGGA R: TAACATGAGGCACCGATGTG
<b>Цистеиновая протеаза</b>	
CASP6	F: CAGAGGAGACAAGTGCCAGA R: CCAGGAGCCGTTTACAGTTT
<b>Простагландин-эндопероксид-синтаза-2 (циклооксигеназа 2)</b>	
PTGS2	F: TAAGTGCGATTGTACCCGGAC R: TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT
<b>Регуляторный фактор интерферона 7</b>	
IRF7	F: GAGACTGGCTATTGGGGGAG R: GACCGAAATGCTTCCAGGG
<b>Бета-актин</b>	
Бета- актин	F: ATTGTCCACCGCAAATGCTTC R: AAATAAAGCCATGCCAATCTCGTC

ных только 650±104 г. К концу опыта наивысшая средняя живая масса была отмечена в интактной подгруппе опытной группы и составила 2403 г (табл. 2).

Бактериальное сообщество слепых отростков кишечника бройлеров через сутки после заражения *S. enteritidis* включало представителей 5 филумов: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Tenericutes*, а также неидентифицированные микроорганизмы (рис. 1,2).

Заражение *S. enteritidis* привело к значительному снижению биоразнообразия микрофлоры кишечника цыплят контрольной группы: среднее количество выявленных филоотипов бактерий в экспериментально инфицированной подгруппе составило 19,3 ( $p \leq$

0,05), тогда как в интактной подгруппе их число оказалось более чем в 2 раза выше. В зараженной подгруппе опытной группы на фоне скармливания Интебио® количество детектированных филоотипов было достаточно высоким - 75 ( $p \leq 0,05$ ).

В микрофлоре кишечника бройлеров контрольной группы на фоне сальмонеллезной инфекции отметили пониженное по сравнению с интактной подгруппой

относительное количество представителей родов *Lactobacillus* и *Bacillus*, а также повышенную концентрацию бактерий семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*. При скармливании добавки Интебио® экспериментально зараженным цыплятам значительных отличий от других групп по содержанию в кишечнике таксонов филума *Firmicutes* не обнаружили.

Через 3 недели после введения культуры *S. enteritidis* проявилась общая тенденция к увеличению бактериального разнообразия микрофлоры слепых отростков кишечника, что соответствует данным литературы [7].

К концу опыта возросло содержание представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* в пищеварительном тракте цыплят всех групп и подгрупп. Также с возрастом произошло заселение слепых отростков кишечника представителями филума *Fusobacteria*.

Также проявились различия по экспрессии генов в тканях слепых

**Таблица 2. Средние показатели динамики массы тела бройлеров контрольной и опытной групп**

Группа	Масса тела суточных бройлеров, г	Подгруппа	Масса тела цыплят (г) после заражения, спустя:	
			1 сутки	3 недели
Контрольная	38,12±1,9	Интактная	650,42±104	2294,0±184
		Экспериментально зараженная <i>S. enteritidis</i>	656,0±53	2004,55±233
Опытная	38,17±2,4	Интактная	743,78±54	2403,22±231
		Экспериментально зараженная <i>S. enteritidis</i>	720,33±81	1936,6±155



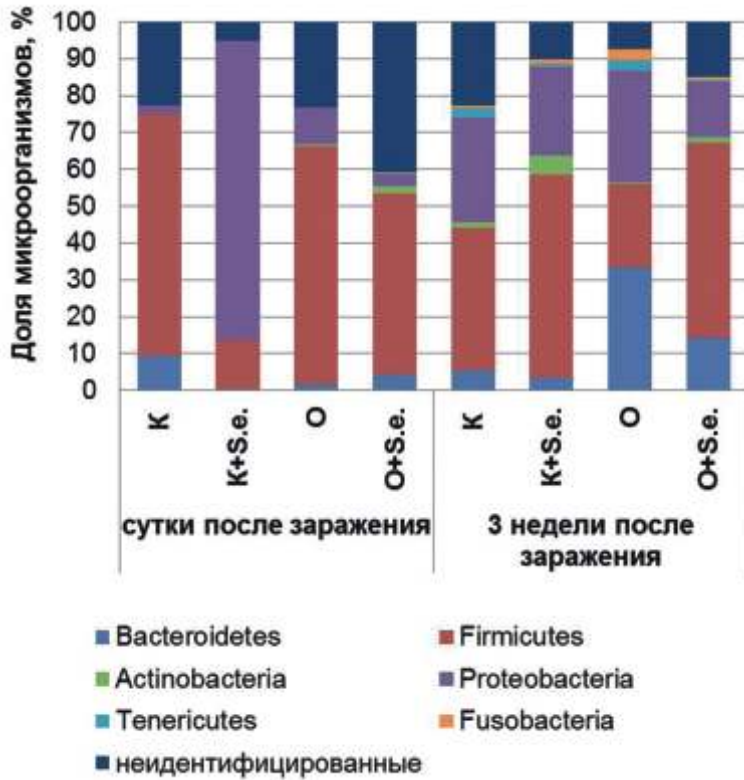


Рисунок 1. Состав микрофлоры слепых отростков кишечника бройлеров (n=3), установленный методом T-RFLP: К - контроль интактная подгруппа; К+S.e. - контрольная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*; О - опытная интактная подгруппа; О+S.e. - опытная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*.

отростков кишечника цыплят разных подгрупп. Ранее сообщалось об увеличении количества цитокинов и иммунных белков (IL1 $\beta$ , IL6, IL8L2, IL12, IL17, IL18, IL22, IL23, IFN, LITAF) у зараженных сальмонеллами цыплят [9,10]. В нашем эксперименте сальмонеллезная инфекция вела к увеличению уровня экспрессии большинства исследованных генов в 2 и более раз. Экспрессия генов цитокинов IL6 и IL8L2 увеличилась в 1,5 раза через сутки после заражения. Кормовая добавка Интебио® способствовала увеличению экспрессии генов интерлейкинов в опытной группе, как в инфицированной *S.*

*enteritidis* (в 4-6 раз), так и в интактной (в 3,5-5,0 раз) подгруппах (рис. 3).

Через 3 недели после заражения наблюдалось выравнивание показателей экспрессии генов в разных группах, что, вероятно, свидетельствует об угасании инфекционного процесса.

Оба фактора (*S. enteritidis* и Интебио®) способствовали повышению экспрессии генов, связанных с иммунитетом, уже через сутки после заражения. Это свидетельствует о том, что эфирные масла, входящие в состав фитобиотика, обладают иммуномодулирующими свойствами. Вероятно, высо-

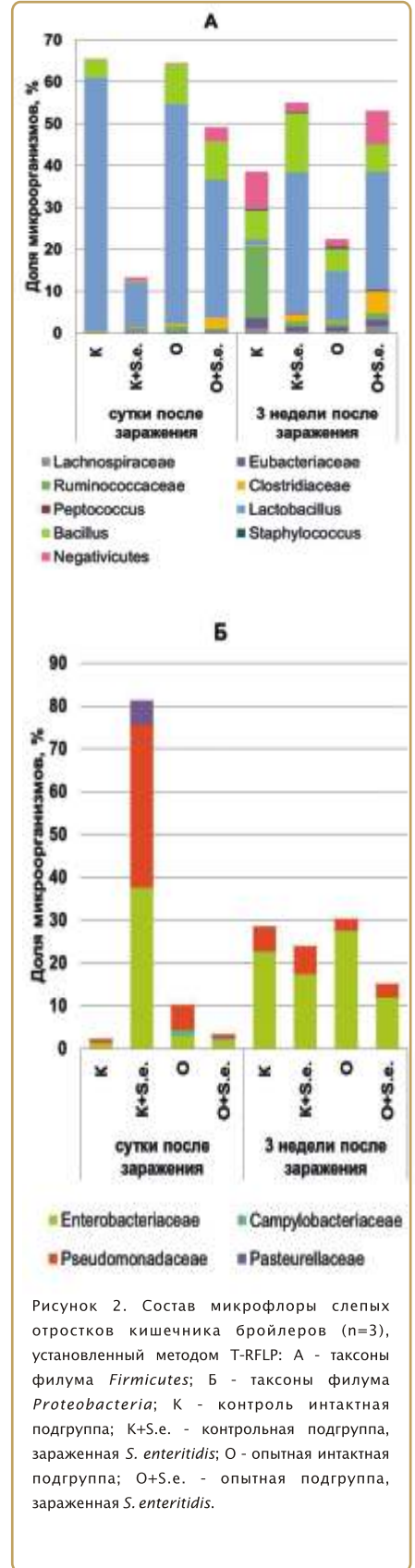


Рисунок 2. Состав микрофлоры слепых отростков кишечника бройлеров (n=3), установленный методом T-RFLP: А - таксоны филума Firmicutes; Б - таксоны филума Proteobacteria; К - контроль интактная подгруппа; К+S.e. - контрольная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*; О - опытная интактная подгруппа; О+S.e. - опытная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*.

кий уровень экспрессии ассоциированных с иммунитетом генов у интактной опытной подгруппы сви-

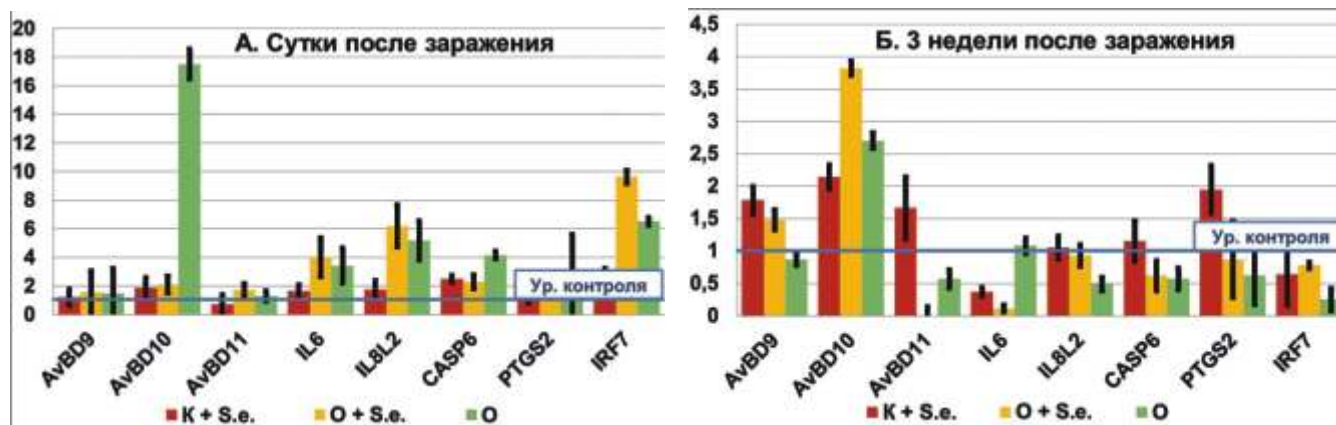


Рисунок 3. Экспрессия участвующих в иммунном ответе генов на фоне применения кормовой добавки в разные сроки после заражения *S. enteritidis*: K+S.e. - контрольная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*; O+S.e. - опытная подгруппа, зараженная *S. enteritidis*; O - опытная интактная подгруппа.

детельствует об активации Интебио® врожденного иммунитета.

**Заключение.** Результаты проведенных исследований подтвердили эффективность скормливания птице кормовой добавки Интебио® на основе эфирных масел. Кормовая добавка Интебио® повышала прирост массы тела, стимулировала врожденный иммунитет, а также способствовала вытеснению патогенных бактерий из микрофлоры кишечника бройлеров.

#### Литература

1. Лаптев Г. Кормление животных и микрофлора // Животноводство России. - 2010. - № 2. - С. 56-57.
2. Грозина А.А. Состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят-бройлеров при воздействии пробиотика и антибиотика (по данным T-RFLP-RT-PCR) // С.-х. биология. - 2014 - № 6. - С. 46-58.
3. Грозина А.А. Влияние состава рациона на микробиологические показатели

желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров при скормливания препаратов Стафак-110 и Целлобактерин-Т: дис. ... канд. биол. наук. - М., 2016. - 181 с.

4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - 480 с.

5. Петрова О.Н. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации в 2016 г. / Петрова О.Н., Караулов А.К., Бардина Н.С., Таценко Е.Е., Коренной Ф.И. - [Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор)]. ФГБУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления ветеринарного надзора. URL: <http://www.fsvs.ru/fsvs/docs/ru/iac/rf/2016/iac2016.pdf> (дата обращения: 22.01.2018).

6. Петрова О.Н. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации в 2017 г. / Петрова О.Н., Караулов А.К., Бардина Н.С., Таценко Е.Е., Коренной Ф.И. - [Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россель-

хознадзор)]. ФГБУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления ветеринарного надзора. URL: <http://www.fsvs.ru/fsvs/docs/ru/iac/rf/2017/iac2017.pdf> (дата обращения: 8.10.2018).

7. Фисинин В.И., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н. [и др.] Изменение бактериального сообщества в желудочно-кишечном тракте кур в онтогенезе // С.-х. биология. - 2016. - Т. 51, №6. - С. 883-890.

8. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method // Methods. - 2001. - V. 25, No 4. - P. 402-408.

9. Berndt A., Wilhelm A., Jugert C. [et al.] Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness // Infect. Immun. - 2007. - V. 75. - P. 5993-6007.

10. Crhanova M., Hradecka H., Faldynova M. [et al.] Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection // Infect. Immun. - 2011. - V. 79. - P. 2755-2763.



Для контакта с авторами:	Александровна	E-mail: dubrovin@biotrof.ru
Лаптев Георгий Юрьевич	E-mail: deniz@biotrof.ru	Новикова Оксана Борисовна
E-mail: laptev@biotrof.ru	Филиппова Валентина	E-mail: ksuvet@mail.ru
Ильина Лариса Александровна	Анатольевна	Кочиш Иван Иванович
E-mail: ilina@biotrof.ru	E-mail: filippova@biotrof.ru	E-mail: prorector@mgavm.ru
Йылдырым Елена	Дубровин Андрей Валерьевич	

### Phytobiotic Protects the Immunity

Laptev G.Yu.<sup>1</sup>, Ilyina L.A.<sup>1</sup>, Yildirym E.A.<sup>1</sup>, Filippova V.A.<sup>1</sup>, Dubrovin A.V.<sup>1</sup>, Novikova O.B.<sup>2</sup>, Kochish I.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>BIOTROF Co., Saint-Petersburg; <sup>2</sup>Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences; <sup>3</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

**Summary:** The effects of phytobiotic mixture of essential oils Intebio® (BIOTROF Co., Russia) in the diets for broiler chicks on the growth efficiency, immune response, and composition of cecal microbiota were studied on two groups of Ross-308 chicks (20 birds per treatment). Control group was fed standard broiler diet; the same diet for experimental group was supplemented with Intebio® since 1 to 42 days of age. The half of each group (10 birds) at 19 days of age was experimentally infected with a pathogenic strain of *Salmonella enteritidis*. Average live bodyweight at 20 days of age in experimental group was 743±54 g vs. 650±104 g in control; at 42 days of age the highest bodyweight was found in the non-infected sub-group of the experimental group. The infection with *S. enteritidis* significantly reduced the biodiversity of cecal microbial population in control group: average number of phylotypes detected by T-RFLP method in the infected sub-group was 19.3 ( $p \leq 0.05$ ) while in the intact sub-group it was more than 2 times higher; in the infected sub-group of the experimental group 75 phylotypes were detected ( $p \leq 0.05$ ). Intebio® was found to increase the expression of interleukin genes, in both infected (4-6 times higher) and intact (3.5-5.0 times higher) sub-groups; in 3 weeks after the infection the parameters of gene expression leveled out. The conclusion was made that Intebio® beneficially affects growth efficiency, immune response, and composition of cecal microbiota in growing chicks.

**Key words:** essential oils, broiler chicks, cecal microbiota, gene expression, T-RFLP, RT-PCR.

#### ОТРАСЛЕВЫЕ НОВОСТИ

### В Карсунском районе хотят построить птицекомплекс за 6,5 млрд рублей

Компания «Ульяновский Племптицерепродуктор» планирует построить в Карсунском районе предприятие по производству инкубационных яиц. Корпорация развития региона готова поддержать проект, сообщила ее пресс-служба.

Предполагается, что новое предприятие будет выпускать до 70 млн инкубационных яиц в год для птицефабрик Ульяновской области и ПФО. Инвестиции в проект оцениваются в 6,5 млрд рублей, планируется создать 250 рабочих мест со средней зарплатой 25-30 тыс. рублей.

Проектно-сметная документация птицекомплекса готова, определен генподрядчик и поставщики оборудования.

Источник: [uldelo.ru](http://uldelo.ru)