

«Замедление репродуктивного старения кур с помощью культур пробиотических микроорганизмов – продуцентов веществ с антиоксидантной и ДНК-протекторной активностью»

ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивное старение является одной из сторон системного процесса старения организма, промотором которого, как известно, являются процессы свободно-радикального окисления (Скулачев, 2012). В начале XX века И.И. Мечников предложил использовать обогащение микрофлоры пробиотическими микроорганизмами как способ замедления процессов старения организма. Долгое время считалось, что продление срока жизни здесь связано только со снижением заболеваемости. Однако оказалось, что пробиотические бактерии обладают выраженным антиоксидантным и ДНК-протекторным действием (Prazdnova et al., 2015).

Задачей данного проекта является разработка способа замедления репродуктивного старения кур за счет введения в их рацион препаратов пробиотических бактерий рода *Bacillus*, способных выделять в культуральную среду вещества с антиоксидантной и ДНК-протекторной активностью.

Физиология. Съемка фоновых физиологических параметров, формирование опытных и контрольной групп птиц.

Экспериментальные исследования по данной теме проводятся в условиях СП «Светлый», являющимся структурной единицей ЗАО «Агрофирма «Восток» (Волгоградская область) - репродуктор II порядка по разведению птицы «Хайсекс браун». Мощность предприятия – 6,5 млн. суточных курочек в год. Регион поставок - Краснодарский и Ставропольский край, Астраханская, Волгоградская, Липецкая, Белгородская, Саратовская, Пензенская, Ростовская и Ярославская области.

Для опыта были сформированы 8 групп суточных цыплят родительского стада кросса «Хайсекс браун» (вывод 25.08.2016 г.), полученных из ООО ППР «Свердловский»: 4 группы курочек по 70 голов и 4 группы петушков по 7 голов в каждой. Группы формировались следующим образом: контрольная, I, II и III – опытные. Контрольная группа получает стандартный рацион, в рацион опытных вводятся препараты пробиотических штаммов (I группа - пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, II группа - пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 и III группа – пробиотический препарат на основе *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895) (табл. 1).

Вышеуказанные препараты вводятся в рацион в составе добавок:

- добавка №1 включает в себя пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, в качестве наполнителя экструдированный тыквенный жмых (входит в состав основного рациона), содержание жизнеспособных спор $10^7 - 10^9$ КОЕ/г;

- добавка №2 - пробиотический препарат на основе штамма *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895, в качестве наполнителя экструдированный тыквенный жмых, содержание жизнеспособных спор $10^7 - 10^9$ КОЕ/г.

- добавка №3 - пробиотический препарат на основе *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 в равных долях, в качестве наполнителя экструдированный тыквенный жмых.

Дозы введения препаратов с добавлением наполнителя составляют 1% в структуре рациона.

Таблица 1 – Схема исследований

Группа	n	Условия кормления
Куры		
Контрольная	70	Основной Рацион
I опытная	70	ОР+добавка №1 (KAMIRA1933)
II опытная	70	ОР+добавка №2(В-1895)
III опытная	70	ОР+добавка №1,2
Петухи		
Контрольная	7	Основной Рацион
I опытная	7	ОР+добавка №1
II опытная	7	ОР+добавка №2
III опытная	7	ОР+добавка №1,2

Подопытная птица содержится в клеточных батареях Big Dutchman (Германия). Кормление осуществлялось стандартным комбикормом и согласно нормам кормления сельскохозяйственных животных (табл.2), разработанных Калашниковым А.П. и др. (Калашников, 2003)., изготовленным на комбикормовом заводе предприятия.

Таблица 2 – Фактическое потребление комбикормов подопытной птицей в процессе выращивания, г

Возраст, нед.		Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
1 (31.08)	куры	810	810	810	810
	петухи	80	80	80	80
2 (02.09)	куры	1360	1380	1380	1360
	петухи	120	125	125	125
3 (14.09)	куры	1800	1820	1820	1800

	петушки	145	148	145	145
4 (21.09)	курочки	2040	2070	2060	2060
	петушки	200	200	200	200
5 (28.09)	курочки	2400	2400	2400	2400
	петушки	235	235	235	235
6 (05.10)	курочки	2700	2700	2700	2700
	петушки	265	265	265	265
7 (12.10)	курочки	2950	2950	2950	2950
	петушки	300	300	300	300
8 (19.10)	курочки	3100	3100	3100	3100
	петушки	320	320	320	320
9 (26.10)	курочки	3450	3450	3450	3450
	петушки	350	350	350	350
10 (03.11)	курочки	3850	3850	3850	3850
	петушки	380	380	380	380
Итого	курочки	24460	24530	24520	24430
	петушки	2395	2403	2400	2400

Постановка научно-хозяйственного эксперимента проводилась с использованием следующих методик: «Основы опытного дела» (Овсянников, 1976), «Методика организации зоотехнических опытов» (Викторов, Менькин, 1991), «Методические указания по организации и проведению НИР» (2013 г.).

Параметры микроклимата поддерживались согласно рекомендациям фирмы производителя кросса «Хайсекс браун».

Взвешивание подопытного молодняка производится еженедельно. Различия между групповыми средними значениями живой массы курочек и петушков оценивались с помощью теста Тьюки (Tukey honest significant differences test), реализованного функцией `glht()` из пакета `multcomp` программной среды R (вер. 3.3.1). Расчет показал, что для суточных (еще не получавших препараты) и 1-недельных особей групповые различия отсутствуют. Это подтверждает эффективность рандомизации особей при разбивке на группы.

Прирост живой массы за первую неделю жизни, как курочек, так и петушков был несколько ниже физиологической нормы, однако в разрезе групп живая масса подопытных цыплят находилась примерно на одном уровне. Незначительное снижение прироста живой массы можно объяснить тем, что продолжительность транспортировки суточных цыплят из ППР «Свердловский» до ППР «Светлый» составила около 40 часов.

Начиная со 2-ой недели живая масса птицы опытных групп имела тенденцию к увеличению относительно контроля (табл.3).

В возрасте 5-ти недель установлена достоверная разница по живой массе цыплят I и II опытных групп по сравнению с контролем, которая сохранилась до 10-ти недельного возраста. Живая масса курочек опытных групп в возрасте 10-ти недель превышала контроль на 4,24 ($P<0,001$, здесь и далее P - параметр t-теста), 3,84 ($P<0,001$) и 3,00% ($P<0,01$); петушков – на 3,96 ($P<0,01$), 3,66 ($P<0,01$) и 2,93% ($P<0,05$) соответственно.

Таблица 3 – Динамика живой массы подопытной птицы

Возраст, нед.		Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
1	2	3	4	5	6
Сутки (25.08)	курочки	36,7 $\pm$ 0,01	36,7 $\pm$ 0,01	36,8 $\pm$ 0,01	36,7 $\pm$ 0,01
	петушки	37,0 $\pm$ 0,01	37,0 $\pm$ 0,01	37,1 $\pm$ 0,01	37,0 $\pm$ 0,01
1 (31.08)	курочки	57,2 $\pm$ 0,39	57,9 $\pm$ 0,41	58,3 $\pm$ 0,27	57,5 $\pm$ 0,31
	петушки	58,3 $\pm$ 0,94	58,8 $\pm$ 0,89	58,7 $\pm$ 0,77	58,6 $\pm$ 0,85
2 (02.09)	курочки	95,2 $\pm$ 1,05	98,4 $\pm$ 1,16	96,7 $\pm$ 1,24	97,8 $\pm$ 1,03
	петушки	96,7 $\pm$ 1,07	100,0 $\pm$ 1,45	100,1 $\pm$ 1,19	98,4 $\pm$ 1,09
3 (14.09)	курочки	145,9 $\pm$ 1,63	148,8 $\pm$ 1,59	146,8 $\pm$ 1,21	146,8 $\pm$ 1,27
	петушки	156,1 $\pm$ 1,86	161,6 $\pm$ 2,13	159,4 $\pm$ 1,43	158,0 $\pm$ 1,39
4 (21.09)	курочки	208,7 $\pm$ 2,18	214,9 $\pm$ 2,91	210,0 $\pm$ 3,14	210,7 $\pm$ 2,73
	петушки	254,4 $\pm$ 2,49	260,4 $\pm$ 3,07	257,3 $\pm$ 3,65	255,4 $\pm$ 4,08
5 (28.09)	курочки	284,6 $\pm$ 2,97	295,3 $\pm$ 3,40*	293,3 $\pm$ 3,21*	288,6 $\pm$ 3,14
	петушки	361,4 $\pm$ 2,89	373,4 $\pm$ 3,41*	371,1 $\pm$ 2,74*	368,6 $\pm$ 2,92
6 (05.10)	курочки	412,3 $\pm$ 4,29	434,1 $\pm$ 5,12**	433,2 $\pm$ 5,51**	429,4 $\pm$ 5,32*
	петушки	478,3 $\pm$ 5,23	498,0 $\pm$ 6,17*	495,9 $\pm$ 4,96*	492,3 $\pm$ 5,09
7 (12.10)	курочки	509,8 $\pm$ 4,81	526,0 $\pm$ 6,12*	525,1 $\pm$ 5,38*	519,2 $\pm$ 5,71
	петушки	619,0 $\pm$ 3,79	652,9 $\pm$ 4,67**	649,8 $\pm$ 5,21**	639,1 $\pm$ 5,51*
8 (19.10)	курочки	628,9 $\pm$ 6,17	654,2 $\pm$ 7,23**	648,5 $\pm$ 7,49*	643,7 $\pm$ 6,97
	петушки	782,2 $\pm$ 3,62	798,8 $\pm$ 4,45*	794,6 $\pm$ 4,01*	789,6 $\pm$ 4,71
9 (26.10)	курочки	727,4 $\pm$ 4,69	761,7 $\pm$ 5,18***	757,6 $\pm$ 6,04***	754,2 $\pm$ 8,12**
	петушки	983,5 $\pm$ 3,17	1010,2 $\pm$ 2,94***	1008,4 $\pm$ 4,11**	997,7 $\pm$ 4,79*
10 (03.11)	курочки	867,9 $\pm$ 4,15	904,7 $\pm$ 5,01***	901,2 $\pm$ 5,84***	894,0 $\pm$ 7,13**
	петушки	1195,8 $\pm$ 5,49	1243,1 $\pm$ 6,93**	1239,6 $\pm$ 6,17**	1230,8 $\pm$ 8,43*
13 (24.11)	курочки	981,3 $\pm$ 8,18	1123,0 $\pm$ 9,86***	1081,0 $\pm$ 8,91***	1022,0 $\pm$ 10,03**
	петушки	1235,0 $\pm$ 10,71	1574,0 $\pm$ 14,69***	1469,0 $\pm$ 15,12***	1426,0 $\pm$ 13,44***

Здесь и далее: * – $P<0,05$; ** – $P<0,01$; *** – $P<0,001$ (t-тест)

В возрасте 13-ти недель живая масса как курочек, так и петушков также превышала контроль: курочек I опытной группы – на 141,7 (14,44%; $P<0,001$), II опытной – на 99,7 (10,16%; $P<0,001$) и III опытной – на 40,7г (4,15%; $P<0,001$); петушков I опытной группы – на 339,0 (27,45%; $P<0,001$), II опытной – на 23,40 (18,94%; $P<0,001$) и III опытной – на 191,0г (15,55%; $P<0,001$). Однако следует отметить, что живая масса птицы контрольной группы находилась на уровне физиологической нормы и соответствовала стандарту кросса «Хайсекс браун».

Сравнивая опытные группы между собой, необходимо отметить, что более высокая живая масса наблюдалась у птицы I опытной группы. Показатели по живой массе птицы II опытной группы незначительно уступали I опытной группе. На протяжении всего периода выращивания живая масса как курочек, так и петушков III опытной группы уступала сверстникам из контроля, I и II групп, и только к 9-ти недельному возрасту имела достоверные различия по сравнению с контрольной (рис.1 и 2).

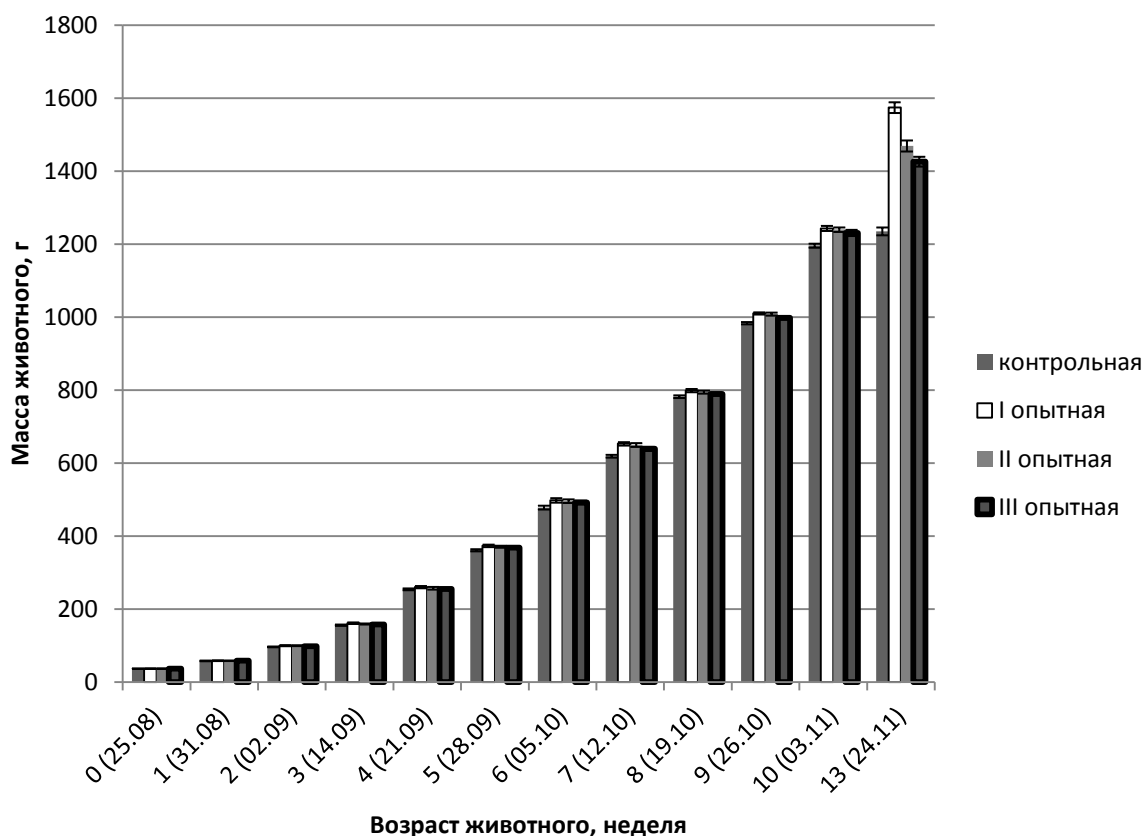


Рис.1 . Динамики массы петушков в контрольной и I, II и III опытных группах.

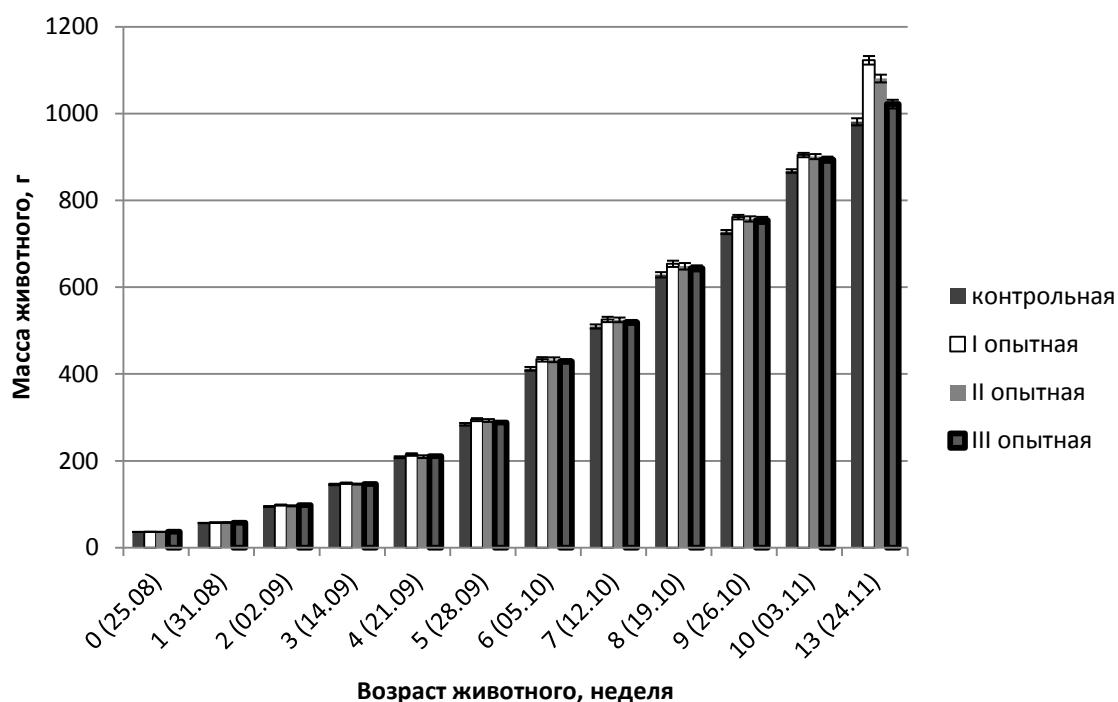


Рис. 2. Динамика массы курочек в контрольной и I, II и III опытных группах.

В 13-ти недельном возрасте была проведена анатомическая разделка птицы (по 3 головы из каждой группы), с целью изучения внутренних и репродуктивных органов.

При выращивании ремонтного молодняка птиц яичных пород ключевым является развитие их репродуктивных органов. В нашем опыте длина яйцевода курочек опытных групп была выше контроля на 11,86 $P<0,05$), 10,17 $P<0,05$) и 5,08% соответственно. Масса яичников курочек опытных групп находилась практически на уровне контроля.

Масса семенников у петушков опытных групп по отношению к контролю имела тенденцию к увеличению, однако разница оказалась статистически недостоверной.

Развитие внутренних органов птиц всех подопытных групп находилось в пределах нормативных показателей по данному кроссу. Вместе с тем, следует отметить, что относительная масса печени курочек опытных групп превышала контроль на 0,37 ($P<0,01$), 0,27 ($P<0,05$) и 0,12%; относительная масса мышечного желудка (без содержимого) – на 0,21 ($P<0,05$), 0,15 ($P<0,05$) и 0,08% соответственно.

Исходя из этого по предварительным данным добавка №1 оказала более существенное влияние на живую массу, развитие внутренних и репродуктивных органов ремонтных курочек и петушков кросса «Хайсекс браун».

Сохранность птицы во всех подопытных группах составила 100%.

Полученные данные гематологического состава крови ремонтного молодняка подопытных групп свидетельствуют о том, что все изучаемые показатели соответствовали

физиологической норме. Уровень эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в крови изменялся как в возрастном, так и в межгрупповом аспектах.

В возрасте 3-х дней (при комплектовании подопытных групп) все изучаемые показатели находились примерно на одном уровне и в пределах физиологической нормы.

В 4-х недельном возрасте у птицы опытных групп (курочки, петушки) наблюдается устойчивая тенденция к увеличению содержания эритроцитов и лейкоцитов (табл. 4). У курочек опытных групп установлено достоверное увеличение содержания гемоглобина в крови по сравнению с контролем на 10,36 ($P<0,05$), 10,09 ($P<0,05$) и 10,06% ($P<0,05$) соответственно.

Таблица 4 – Гематологические параметры ремонтного молодняка

Показатель		Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
3 дня					
Эритроциты, $10^{12}/л$	курочки	2,67±0,04	2,66±0,03	2,67±0,04	2,67±0,04
	петушки	2,54±0,03	2,56±0,04	2,55±0,03	2,54±0,03
Лейкоциты, $10^9/л$	курочки	26,94±0,51	27,01±0,64	26,98±0,49	27,04±0,59
	петушки	26,69±0,44	26,75±0,52	26,76±0,63	26,78±0,67
Гемоглобин, г/л	курочки	99,41±2,73	99,64±2,84	99,59±2,37	99,49±3,11
	петушки	96,15±2,81	96,19±2,91	96,16±2,78	96,30±2,80
4 недели					
Эритроциты, $10^{12}/л$	курочки	2,88±0,05	2,99±0,06	2,95±0,07	2,96±0,06
	петушки	2,69±0,04	2,78±0,07	2,71±0,06	2,70±0,05
Лейкоциты, $10^9/л$	курочки	27,36±0,49	27,91±0,48	27,86±0,74	27,85±0,64
	петушки	26,92±0,31	27,23±0,94	27,19±0,51	27,11±0,59
Гемоглобин, г/л	курочки	109,84±2,03	121,17±1,49*	120,93±1,52*	120,89±1,31*
	петушки	101,15±1,74	107,14±2,43	107,09±2,49	106,33±2,19
9 недель					
Эритроциты, $10^{12}/л$	курочки	2,98±0,05	3,16±0,04	3,11±0,06	3,08±0,08
	петушки	2,83±0,04	3,08±0,05	3,07±0,04	3,06±0,04
Лейкоциты, $10^9/л$	курочки	27,78±0,54	28,43±0,71	28,39±0,55	28,41±0,37
	петушки	27,18±0,46	27,91±0,84	27,88±0,49	27,69±0,29
Гемоглобин, г/л	курочки	118,44±1,71	133,84±2,19*	133,12±2,01*	131,18±1,91*
	петушки	109,57±1,24	119,46±1,63*	118,87±1,13*	118,71±1,56

В возрасте 9-ти недель также прослеживается увеличение содержания эритроцитов и лейкоцитов в крови ремонтного молодняка опытных групп по отношению к контролю. Содержание гемоглобина в крови как у курочек, так и петушков достоверно возросло: у курочек I опытной группы на 13,02 ($P<0,05$), II опытной – на 12,39 ($P<0,05$), III – на 10,76% ($P<0,05$) по сравнению с контролем; у петушков – на 9,02 ($P<0,05$), 8,49 ($P<0,05$) и 8,34% ($P<0,05$) соответственно.

Следует отметить, что у петушков подопытных групп как в возрастном аспекте, так и в разрезе групп все изучаемые показатели оказались несколько ниже, чем у курочек.

Биохимический состав сыворотки крови ремонтного молодняка подопытных групп также находился в пределах физиологической нормы (табл. 5).

Таблица 5 – Биохимический состав сыворотки крови ремонтного молодняка

Показатель		Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
1	2	3	4	5	6
3 дня					
Общий белок, г/л	курочки	48,10±0,53	48,12±0,80	48,10±0,73	48,11±0,78
	петушки	48,84±0,61	48,81±0,59	48,85±0,67	48,84±0,77
Альбумины, г/л	курочки	16,35±0,16	16,38±0,21	16,36±0,18	16,37±0,14
	петушки	16,64±0,25	16,65±0,72	16,65±0,44	16,64±0,39
Относительные, %	курочки	33,99±0,27	34,04±0,29	34,01±0,81	34,03±0,64
	петушки	34,07±0,53	34,08±0,41	34,07±0,22	34,04±0,31
Глобулины, г/л	курочки	31,75±0,40	31,74±0,22	31,74±0,52	31,74±0,61
	петушки	32,20±0,29	32,16±0,41	32,20±0,69	32,20±0,74
Относительные, %	курочки	66,01±1,54	65,96±1,19	65,99±2,03	65,97±2,15
	петушки	65,93±1,69	65,89±1,27	65,92±1,84	65,93±2,01
Белковый индекс	курочки	0,51	0,52	0,52	0,52
	петушки	0,52	0,52	0,52	0,52
Мочевина, ммоль/л	курочки	2,35±0,09	2,35±0,08	2,36±0,07	2,35±0,11
	петушки	2,33±0,08	2,34±0,13	2,33±0,11	2,33±0,09
Глюкоза, ммоль/л	курочки	4,67±0,07	4,69±0,09	4,67±0,08	4,68±0,08
	петушки	4,68±0,09	4,68±0,07	4,69±0,05	4,68±0,09
4 недели					
Общий белок, г/л	курочки	51,77±2,55	54,84±2,61	54,69±3,71	54,03±2,37
	петушки	52,49±2,45	55,12±1,59	55,09±2,81	54,92±1,64
Альбумины, г/л	курочки	20,96±1,27	22,51±1,18	22,39±1,11	22,07±1,14
	петушки	21,39±1,96	23,15±1,43	23,18±1,69	22,96±1,71
Относительные, %	курочки	40,49±1,40	41,05±2,19	40,94±2,13	40,85±1,76
	петушки	40,75±1,53	42,00±1,74	42,08±1,46	41,81±1,39
Глобулины, г/л	курочки	30,81±1,23	32,33±1,37	32,30±1,61	31,96±1,18
	петушки	31,10±1,46	31,97±1,32	31,91±1,54	31,96±1,19
Относительные, %	курочки	59,51±2,13	58,95±2,89	59,06±2,49	59,15±2,04
	петушки	59,25±3,46	58,00±3,11	57,92±2,98	58,19±2,79
Белковый индекс	курочки	0,68	0,69	0,69	0,69
	петушки	0,69	0,72	0,73	0,72
Мочевина, ммоль/л	курочки	3,12±0,05	3,43±0,07	3,41±0,09	3,39±0,06
	петушки	3,39±0,07	3,56±0,09	3,55±0,08	3,55±0,11
Глюкоза, ммоль/л	курочки	7,25±0,09	7,94±0,07**	7,89±0,08**	7,87±0,09**
	петушки	6,91±0,11	7,88±0,09**	7,80±0,12*	7,80±0,11*
9 недель					

Общий белок, г/л	курочки	52,61±0,41	55,83±0,39*	55,79±0,48*	55,75±0,37*
	петушки	53,78±0,38	57,19±0,44*	57,01±0,35*	56,99±0,48*
Альбумины, г/л	курочки	21,15±0,14	23,35±0,15**	23,32±0,11**	23,31±0,12**
	петушки	22,09±0,12	25,12±0,17**	24,98±0,09**	24,72±0,14*
Относительные, %	курочки	40,20±0,44	41,82±0,32	41,80±0,58	41,81±0,77
	петушки	41,07±0,87	43,93±0,69	43,82±0,24	43,38±0,86
Глобулины, г/л	курочки	31,46±1,09	32,48±1,11	32,47±1,17	32,44±1,13
	петушки	31,69±1,21	32,07±1,33	32,03±1,18	32,27±1,64
Относительные, %	курочки	59,80±2,67	58,18±2,19	58,20±3,04	58,19±2,27
	петушки	58,93±3,14	56,07±2,67	56,18±2,11	56,62±3,48
Белковый индекс	курочки	0,67	0,72	0,72	0,72
	петушки	0,70	0,78	0,78	0,77
Мочевина, ммоль/л	курочки	3,24±0,09	3,85±0,07*	3,84±0,05*	3,74±0,04*
	петушки	3,32±0,06	3,96±0,05*	3,94±0,08*	3,92±0,09*
Глюкоза, ммоль/л	курочки	7,59±0,08	8,42±0,07*	8,40±0,07*	8,34±0,09*
	петушки	7,55±0,09	8,46±0,08*	8,38±0,05*	8,36±0,08*

В возрасте 3-х дней все изучаемые показатели у птицы подопытных групп находились на одинаковом уровне.

Использование в рационах курочек и петушков опытных групп изучаемых добавок оказало положительное влияние на содержание белка и его фракций уже в 4-х недельном возрасте.

Отмечена четкая тенденция к увеличению содержания в сыворотке крови птицы опытных групп общего белка: у курочек в I опытной группе на 5,93; II опытной – на 5,64; III – на 4,37%; у петушков на 5,01; 4,95 и 4,63% относительно контроля. Аналогичная ситуация наблюдается и по уровню альбуминов в сыворотке крови курочек и петушков. Содержание мочевины также несколько увеличивается у птицы опытных групп, что характеризует более высокий уровень белкового обмена в их организме.

Активизируется и углеводный обмен в организме курочек и петушков опытных групп, так как содержание глюкозы в сыворотке крови достоверно увеличилось по сравнению с контролем: у курочек в I опытной группе на 9,52 (P<0,01), во II опытной – на 8,83 (P<0,01) и в III – на 8,55% (P<0,01); у петушков - на 14,00 (P<0,01), 12,88 (P<0,05) и 12,88 (P<0,05).

В 9-ти недельном возрасте у курочек и петушков опытных групп по сравнению с контролем установлена достоверная разница по содержанию общего белка в сыворотке крови: у курочек в I опытной группе на 6,12 (P<0,05), во II опытной – на 6,04 (P<0,05), в III – на 5,97% (P<0,05); у петушков - на 6,34 (P<0,05), 6,01 (P<0,05) и 5,96% (P<0,05) соответственно. Уровень альбуминов в сыворотке крови у курочек опытных групп превысил

контроль на 10,40 (P<0,01), 10,26 (P<0,01) и 10,22% (P<0,05); петушков – на 13,72 (P<0,01), 13,08 (P<0,01) и 11,91% (P<0,01).

Высокие показатели мочевины в сыворотке крови птицы свидетельствуют о высокой интенсификации процессов белкового метаболизма.

Для производства энергии в организме животных быстрее всего вовлекаются углеводы. Основным углеводом плазмы является глюкоза, содержание которой для каждого вида животных удерживается на относительно постоянном уровне, хотя функционирующие клетки организма непрерывно поглощают из крови глюкозу для покрытия своих энергетических расходов. В нашем опыте содержание глюкозы увеличилось: у курочек опытных групп на 10,93 (P<0,05), 10,67 (P<0,05) и 9,88% (P<0,05); петушков – на 12,05 (P<0,05), 10,99 (P<0,05) и 10,73% (P<0,05) относительно контроля.

В заключении следует отметить, что все изучаемые добавки оказали положительное влияние на интенсивность обмена веществ в организме опытных курочек и петушков кросса «Хайсекс браун». Однако, более высокие показатели в разрезе групп оказались в I опытной, где испытывалась добавка №1.

Микробиология. Фоновый мониторинг микрофлоры кур.

Для мониторинга микрофлоры отбирали помет кур, а также делали мазки из клоаки. Даты отбора проб: 11 сентября 2016; 11 октября 2016; 11 ноября 2016; 26 ноября 2016.

Для мазков использовали систему Transystem – Amies medium (Copan diagnostics США). Данные мазков и посевов помета качественно не отличались по микробиологическим параметрам.

Анализ микрофлоры проводили по стандартным методикам (Методические рекомендации..., 2004).

В процессе мониторинга не было выявлено статистически достоверных изменений между микрофлорой кур и петухов в различных группах (табл. 6). Во всех группах не было отмечено снижения в количественном и процентном соотношении лакто- и бифидобактерий. Количество бифидобактерий во всех пробах на всех этапах отбора превышало 10^6 КОЕ/г.

Таблица 6. Количество бактерий, выделенных из помёта кур.

Дата отбора	Номер группы	<i>Lactobacillus</i> , 10^7 КОЕ/г	<i>E.coli</i> и колиформы 10^7 КОЕ/г	<i>Enterococcus</i> 10^6 КОЕ/г	<i>Staphylococcus</i> 10^6 КОЕ/г	<i>Candida</i> 10^4 КОЕ/г	<i>B. amylo- liquefaciens</i> B1895 10^3 КОЕ/г
11.09.16	Контроль	1,0±0,2	6,1±0,8	6,3±0,9	5,8±0,8	1,0±0,3	-
	I	1,3±0,2	9,2±0,8	8,6±0,9	3,8±1,0	5,1±1,2	-
	II	0,6±0,3	8,1±1,1	2,1±0,3	1,3±0,6	3,6±0,6	-
	III	0,7±0,4	5,8±0,8	1,9±0,3	1,8±0,3	2,8±0,5	-

11.10.16	Контроль	1,0±0,3	2,7±0,3	3,2±0,7	3,9±0,6	10,1±1,2	-
	I	0,6±0,2	2,1±0,5	5,7±0,8	3,9±0,8	5,7±0,9	-
	II	0,5±0,3	2,3±0,5	5,5±1,2	5,2±1,2	5,0±1,2	-
	III	0,7±0,2	1,8±0,3	0,8±0,3	4,8±0,7	6,8±0,9	-
11.11.16	Контроль	1,2±0,4	4,5±0,6	5,3±1,2	2,9	11,2±1,4	-
	I	1,4±0,3	2,0±0,6	0,7±0,3	2,2±0,3	6,0±1,0	-
	II	1,3±0,4	1,5±0,4	1,2±0,4	2,0±0,6	8,0±1,2	2,0±0,5
	III	1,4±0,3	1,0±0,1	1,4±0,3	2,3±0,6	8,1±1,0	1,5±0,5
26.11.16	Контроль	1,2±0,1	8,3±1,1	1,7±0,3	3,6±1,0	0,3±0,1	-
	I	2,3±0,4	5,6±0,6	2,0±0,5	1,3±0,4	2,3±0,5	-
	II	2,5±0,3	5,6±0,8	1,4±0,4	1,1±0,2	3,0±0,7	-
	III	2,5±0,4	7,8±1,2	1,9±0,5	1,8±0,5	6,1±0,9	2,0±0,5

Бактерий р. *Salmonella* и *Shigella* ни в одной пробе за все время исследования обнаружено не было.

Количество бактерий р. *Lactobacillus* в контроле не изменялось во времени и составило от $(1,0\pm0,2)10^7$ до $(1,2\pm0,1)10^7$ КОЕ/г. В опытных группах количество лактобацилл увеличивалось со временем и достигло от $(2,3\pm0,4)10^7$ до $(2,5\pm0,3)10^7$ КОЕ/г.

Количество колиформных бактерий колебалось в пределах от $(1,0\pm0,1)10^7$ до $(9,2\pm0,8)10^7$ КОЕ/г. В пробе от 11 октября и в последующих наблюдалось снижение количества колиформных бактерий у групп, получавших все типы пробиотических препаратов, по сравнению с контрольной группой.

Количество бактерий р. *Staphylococcus* составило от $(1,1\pm0,2)10^6$ до $(5,8\pm0,8)10^6$ КОЕ/г. Можно отметить тенденцию к снижению со временем количества стафилококков в помёте всех исследованных групп. Количество стафилококков в контрольной группе было выше, чем в опытных, во всех случаях, кроме пробы от 11 октября.

Количество энтерококков колебалось в пределах от $(0,7\pm0,3)10^6$ до $(8,6\pm0,9)10^6$ КОЕ/г, в целом отмечается тенденция к снижению количества энтерококков в помёте всех групп.

Помимо прочего, было отмечено присутствие в помёте незначительного количества дрожжей р. *Candida*, которое варьировало в пределах от $(0,3\pm0,1)10^4$ до $(11,2\pm1,4)10^4$ КОЕ/г.

Первоначально в помёте кур бацилл обнаружено не было. После 10 недель введения препаратов было отмечено появление бактерий *B. amyloliquefaciens* B1895 в количестве $(1,5\pm0,5)10^3$ и $(2\pm0,5)\cdot10^3$ КОЕ/г в помёте у кур, получавших препарат на основе *B. amyloliquefaciens* B1895 (группа II) или смешанный препарат (группа III).

Формирование набора пробиотических штаммов бактерий и определение их активности. При разработке плана исследований, исходя из опубликованных ранее данных, для проекта были отобраны два пробиотических штамма: *Bacillus subtilis* KATMIRA1933, выделенный из кисломолочного продукта (Sutyak et al., 2008) и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, выделенный из почвы. Штаммы были отобраны в связи с взаимно-дополнительным

характером их пробиотических параметров (Algburi et al., 2015; Prazdnova et al., 2015). Для практического применения препаратов на основе данных штаммов было необходимо установить, сохраняются ли подобные свойства в полной мере при изготовлении пробиотического препарата методом твердофазного культивирования, использованным в данном проекте ввиду технологических преимуществ. В связи с этим была проведена серия опытов с использованием системы бактериальных Lux-биосенсоров. Методика постановки теста и расчета протекторной активности подробно описана в работе (Prazdnova et al., 2015).

Было установлено, что метаболиты *B. subtilis* KATMIRA1933 проявляют значительную ДНК-протекторную активность, в большинстве случаев снижающуюся при разведении препарата (экстракта) водой.

Эксперименты показали, что ДНК-протекторные и антиоксидантные свойства характерны и для сухого препарата, полученного методом твердофазной ферментации (табл. 7-12). Два типа активности обеспечиваются разными веществами или группами веществ.

Таблица 7. Антигенотоксическая (ДНК-протекторная) активность *B.subtilis* Katmira-1933 (%), определенная с помощью биосенсорного штамма *E.coli* MG1655 pRecA-lux.

	Количество КОЕ/мл, соответствующее разведению экстракта		
	10^6	10^7	10^8
Культура	6,70±1,45	38,60±3,44	5,63±1,98
Препарат	25,31±3,13	75,90±5,94	н/о*

* не определяли, т.к. максимальный титр в препарате был ниже

Таблица 8. Антигенотоксическая (ДНК-протекторная) активность *B.subtilis* Katmira-1933 (%), определенная с помощью биосенсорного штамма *E.coli* MG1655 pColD-lux.

	Количество КОЕ/мл, соответствующее разведению экстракта		
	10^6	10^7	10^8
Культура	22,13±4,56	42,66±6,64	58,41±9,94
Препарат	67,02±8,51	86,60±5,07	н/о*

* не определяли, т.к. максимальный титр в препарате был ниже

Как можно видеть из представленных данных, метаболиты *B.subtilis* Katmira-1933 проявляют значительную ДНК-протекторную активность, снижающуюся при разведении препарата (экстракта) водой, за исключением пробы культуры с титром 10^8 КОЕ/мл, в которой значение протекторной активности ниже, чем в последующих разведениях. Вероятно, в препарате с настолько высоким содержанием клеток их метаболическая активность несколько снижается.

Кроме того, можно видеть, что во всех пробах активность метаболитов, выделенных из сухого препарата, выше, чем аналогичная активность культуры, выращенной в жидкой среде.

Метаболиты *B.amyloliquifaciens* В-1895 также проявляют ДНК-протекторную активность, чуть более низкую, чем *B.subtilis* Katmira-1933 (максимальные значения 71,24% против 86,6%, соответственно). В большинстве проб активность метаболитов, выделенных из сухого препарата, не имела статистически достоверных отличий от таковой для культуры, выращенной в жидкой среде (табл. 9-10).

Таблица 9. Антигенотоксическая (ДНК-протекторная) активность *B.amyloliquifaciens* В-1895 (%), определенная с помощью биосенсорного штамма *E.coli* MG1655 pRecA-lux.

	Количество КОЕ/мл, соответствующее разведению экстракта		
	10^6	10^7	10^8
Культура	3,12±1,3	20,98±8,03	36,99±1,34
Препарат	2,56±0,74	19,50±2,43	22,16±5,67

Таблица 10. Антигенотоксическая (ДНК-протекторная) активность *B.amyloliquifaciens* В-1895 (%), определенная с помощью биосенсорного штамма *E.coli* MG1655 pColD-lux.

	Количество КОЕ/мл, соответствующее разведению экстракта		
	10^6	10^7	10^8
Культура	43,79±6,22	71,24±8,24	73,57±10,12
Препарат	53,73±6,35	68,74±5,18	66,12±9,47

Результаты экспериментов по изучению антиоксидантной активности представлены в таблицах 11-12.

Таблица 11. Антиоксидантная активность *B.subtilis* Katmira-1933 (%), определенная с помощью биосенсорного штамма *E.coli* MG1655 pSoxS-lux.

	Количество КОЕ/мл, соответствующее разведению экстракта		
	10^6	10^7	10^8
Культура	60,19±3,69	30,66±1,69	39,77±1,61
Препарат	7,97±1,33	13,12±3,71	н/о*

* не определяли, т.к. максимальный титр в препарате был ниже

Таблица 12. Антиоксидантная активность *B.amyloliquifaciens* B-1895 (%), определенная с помощью биосенсорного штамма *E.coli* MG1655 pSoxS-lux.

	Количество КОЕ/мл, соответствующее разведению экстракта		
	10^6	10^7	10^8
Культура	42,80±13,45	26,29±2,82	49,40±5,11
Препарат	16,32±2,80	13,14±2,88	15,00±1,19

Как можно заметить из представленных данных, метаболиты обоих штаммов проявляют антиоксидантную активность, причем, как и в случае с ДНК-протекторной активностью, для штамма *B.subtilis* Katmira-1933 эффект выше, чем для *B.amyloliquifaciens* B-1895 (60,19 % против 42,80 %, соответственно). Однако активность метаболитов, выделенных из сухого препарата, для обоих штаммов в большинстве проб статистически достоверно отличалась от таковой для экстракта из жидкой культуры, и была значительно ниже (в 1,2-7,6 раз для *B.subtilis* Katmira-1933 и 1,8-3,3 раз для *B.amyloliquifaciens* B-1895, соответственно).

Таким образом, можно заключить, что ДНК-протекторные и антиоксидантные свойства обеспечиваются разными веществами или группами веществ. Наблюдаемое в наших опытах отсутствие зависимости доза-эффект (по крайней мере, в изученном диапазоне доз) для антиоксидантного эффекта, в отличие от ДНК-протекторного, может служить подтверждением данного тезиса. С этим заключением согласуется также тот факт, что, как установлено в наших предшествующих опытах, антиоксидантный эффект снижается при прогревании экстракта до 85°C, тогда как на ДНК-протекторный прогревание экстракта не влияет (Prazdnova et al, 2015). Невысокая антиоксидантная активность экстракта сухого препарата по сравнению с полученным из жидкой культуры может объясняться воздействием высоких температур при сушке препарата.

Безусловную актуальность имеет вопрос о химической природе веществ, обеспечивающих наблюдаемые ДНК-протекторные и антиоксидантные свойства. Как показали наши исследования, выполненные в рамках данного проекта, ключевой аминокислотой, обуславливающей антиоксидантные и ДНК-протекторные свойства

пептидов может быть лизин (Празднова и др, 2016). Эксперименты с синтетическими олигопептидами показали, что способность олигопептидов защищать клетки от действия физических прооксидантных факторов (УФ-облучение) связана с наличием в молекуле остатка лизина. Для химических прооксидантов (диоксидин) наблюдается схожая, хоть и менее строгая закономерность. Описанный эффект также коррелирует с ДНК-протекторной активностью исследуемых олигопептидов. Таким образом, богатые лизином белки сои (субстрата для ферментации использованных нами бацилл) в принципе могут быть источником криптопептидов с адресной активностью. Проверка этого предположения станет задачей наших дальнейших исследований.

В ходе физиологических исследований было выявлено, что при использовании двух штаммов одновременно физиологический эффект, проявляющийся в ускорении набора массы, проявлялся заметно слабее, чем при использовании штаммов по отдельности. Эти наблюдения позволяют поставить вопрос о том, какие физиолого-биохимические отличия двух штаммов могут быть причиной наблюдаемого взаимодействия? Одним из главных отличий *B. subtilis* KATMIRA1933 от *B. amyloliquefaciens* B-1895 является способность штамма KATMIRA1933 к выработке субтилозина А. Для оценки возможности участия субтилозина в наблюдаемом феномене мы оценили способность субтилозина А подавлять QS в Грам-положительных (*Listeria monocytogenes*, штамм ScottA), Грам-отрицательных (*Escherichia coli*, штамм/серотип O157:H7) и Грам-вариабельных бактериях (*Gardnerella vaginalis*, штамм ATCC 14018). Данные микроорганизмы выбраны в связи с хорошей изученностью механизмов как QS, так и образования биопленок (Colagiorgi et. al., 2016; Sharma et. al., 2010; Machado et. al., 2016).

Способность субтилозина А подавлять рост и образование биопленок были отмечены в экспериментах со всеми исследованными штаммами бактерий. В основе наблюдаемых эффектов лежит существенное уменьшение образования индуктора QS, который обеспечивает образование бактериями биопленок. Подобные эффекты вполне могут способствовать существенному переходу микробиоты ЖКТ в планктонную форму с активацией неспецифического иммунитета. В заключение необходимо отметить, что оба штамма, отобранные нами для физиологического эксперимента проявили сходную физиологическую активность, выражающуюся в стимуляции роста, как курочек, так и петушков. Поэтому их выбор представляется вполне оправданным. При этом механизмы наблюдаемой активности могут быть разными, что требует дальнейшего изучения. Неожиданным было снижение эффекта при объединении двух штаммов в одной рецептуре. Необходимо исследовать механизм этого явления. Описываемое явление можно было бы

объяснить антагонизмом данных штаммов, однако предварительные эксперименты показывают, что антагонизма эти два штамма не проявляют (рис.3).



Рис 3. Совместный посев KATMIRA 1933 и В – 1895 на LB-агар

По нашим сведениям, опубликованная в рамках данного проекта статья - это первое сообщение о возможности предотвращения образования биопленок опасного патогена *G. vaginalis* в результате подавляющего QS действия субтилокина А, антимикробного белка (бактериоцина), продуцируемого спорообразующим пробиотиком.

Запуск участка производства пробиотических препаратов для исследования

На базе Поволжского научно-исследовательского института производства и переработки мясомолочной продукции в 2016 г был запущен участок производства необходимых для исследования пробиотических препаратов. Для организации лабораторного производства пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* была применена твердофазная ферментация.

Оптимальным субстратом для пробиотических бактерий являются гидратированные соевые бобы, прошедшие термообработку. Используемая технология и получаемый по ней препарат были апробированы нами ранее (Chistyakov et al., 2015)

Пробиотические штаммы, стартеры.

Для использования в качестве инокулята используются культуры штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* 1895 и *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. В качестве стартера для выработки 800 – 1000 г сухого препарата использовали чашки Петри со средой LB, покрытые газоном бактерий.

Оборудование.

Электроплитка Веста двухконфорочная (Россия), Скороварка Mayer&Boch MB-3031 (КНР), Термостат электрический суховоздушный ТС – 80 (Украина), мясорубка Braun Pover Plus 1300 (Чешская Республика), Мельница проб МРП-2 (Россия)

Описание технологического процесса

Взвешивается необходимое количество соевых бобов. Оптимально для лабораторной технологии 1 кг. Бобы промываются проточной водопроводной водой. Бобы сои замачиваются на 12 часов в воде в эмалированной емкости при температуре 20-22°C. Бобы сои стерилизуются в скороварке с использованием специального вкладыша для обработки «на пару» при 115°C в течение 40 минут. Проавтоклавированные бобы переносятся в емкость для инокулирования и охлаждаются до 60°C. В бобы вносится агар с газоном пробиотического штамма с одной чашки Петри. Культура бактерий тщательно перемешивается с бобами. Инокулированные соевые бобы помещаются в кастрюлю с плоским дном и неплотно закрываются крышкой. Сосуды с инокулированными бобами сои помещаются в инкубатор. Процесс инкубации длится в течение 24- часов при температуре 45°C. Ферментированный субстрат измельчается при помощи электрической либо ручной мясорубки.

После каждой инкубации термостат-инкубатор и детали мясорубки, контактирующие с бактериями, подвергают влажной уборке с применением моющих средств и, затем, обрабатывают 3% перекисью водорода и высушивают. Пластиковые поддоны после инкубации обрабатывают таким же образом. Измельченный препарат распределяется тонким слоем на металлических подносах и высушивается при температуре 50 °C до влажности 8 - 10%. Высушенный комплексный пробиотический препарат измельчают при помощи бытовой мельницы.

Готовый пробиотический препарат храниться в холодильнике при температуре $(4\pm 2)^0$ и влажности не более 10% в течение одного года, при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

За отчетный период проведено по 5 выработок препаратов каждого штамма. Выход сухого препарата за одну выработку составил 750 ± 30 г, содержание жизнеспособных клеток использованных штаммов составило $10^9 - 10^{10}$ КОЕ в одном грамме сухого препарата.

Молекулярная биология. Разработка методов оценки стабильности митохондриальной ДНК и длины теломер кур. Съемка фоновых параметров.

Оценка длины теломер кур.

Длина теломер может служить показателем, характеризующим старение организмов (Crisuolo et al., 2009; Paul, 2011). Однако скорость уменьшения теломерных участков

довольно индивидуальна, так как на нее влияет большое количество факторов, в частности окислительный стресс (Houben et al., 2008; Lin et al., 2012).

Метод измерения теломера человека с помощью количественной ПЦР был разработан в 2002 году (Cawthon, 2002) и в дальнейшем был модифицирован для других млекопитающих, и ряда видов птиц (O'Callaghan et al., 2008; Criscuolo et al., 2009; O'Callaghan, Fenechet, 2011; Heidinger et al., 2014). Нами был разработан метод оценки длины теломер у кур, при этом за основу был взят метод определения относительных размеров теломерных участков хромосом у зябликов (Heidinger et al., 2014). В разработанной методике был использован новый протокол консервации проб, модифицирован метод выделения ДНК, использован новый внутренний стандарт для количественной ПЦР, проведен дизайн праймеров для внутреннего стандарта.

В результате нами были получены следующие количественные соотношения ампликонов теломерных областей к ампликонам однокопийного региона (*GAPDH*): для 76 суточных птиц этот показатель составил 4.75 ± 2.35 , для 330 суточных – 2.37 ± 1.47 и для 458 суточных 2.20 ± 1.63 . Следовательно, наибольшая длина теломерных участков наблюдается у наиболее молодой возрастной группы (76 суток), а меньшая – у более возрастных птиц (330 и 458 суток), что согласуется с результатами, полученными на других видах животных и птиц (Criscuolo et al., 2009; Schoeftner, Blasco, 2010). Большой разброс полученных показателей относительной длины теломерных участков хромосом внутри каждой группы можно объяснить индивидуальной изменчивостью (O'Callaghan, Fenechet, 2011; Mather et al., 2011). Таким образом, полученные предварительные результаты, подтвердили информативность методики для дальнейших исследований.

Используя данную методику, было проведено исследование фоновых значений относительной длины теломерных участков у 30 особей возраста 10 недель в каждой группе: контрольной, и трех опытных. Были получены следующие количественные соотношения ПЦР-продуктов теломерных областей к ПЦР-продуктам гена *GAPDH*: контрольная группа – 5.41 ± 2.24 , I группа – 2.51 ± 0.59 , II группа – 3.58 ± 0.95 , III группа – 2.24 ± 0.30 . Таким образом обнаружено статистически значимое уменьшение относительной длины теломер в I (2.2 раза), II (1.5 раза) и III (2.4 раза) группах по сравнению с контролем (I группа). Во II группе значение показателя достоверно выше (в 1.12 раза), чем в IV группе. А длина теломерных участков у птиц III группы в 1.4 и 1.6 раза больше чем у птиц II и IV групп, соответственно.

Оценка стабильности митохондриальной ДНК.

Повышенная генерация активных форм кислорода приводит к окислительным повреждениям митохондриальной ДНК (Sedelnikova et al., 2010), уровень которых можно оценить количественно, например, методом количественной ПЦР. Принцип метода

заключается в относительной количественной оценке длинных (более 5 т.п.н.) ПЦР-продуктов (Santos et al., 2002).

Нами данный метод был модифицирован применительно к крови кур. Были подобраны оптимальные протоколы выделения ДНК, условия проведения ПЦР, проведен дизайн праймеров (рис.4).

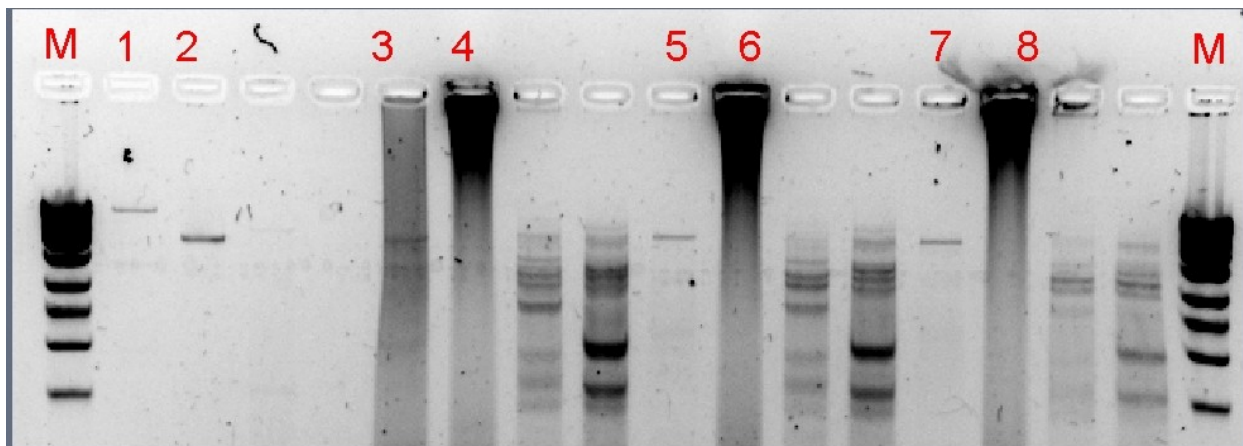


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов митохондриальной ДНК.

М – маркер длинн (1 – 10 т.п.н.); 1,2 – ПЦР-продукты, полученные с использованием LongAmp полимеразы (1 -Ампликон 10070 п.н., 2 – Ампликон 5061 п.н.); 3-8 - ПЦР-продукты, полученные с использованием Encyclo полимеразы, с различной температурой отжига праймеров : 61 C° - 3,4; 62 C° - 5,6; 63C° - 7,8.

При использовании Encyclo полимеразы с увеличением температуры отжига детектируется специфичный ПЦР-продукт размером 5061 п.н. Однако при использовании Encyclo полимеразы в отличие от LongAmp полимеразы специфичный продукт размером 10070 п.н. не выявлен.

Для определения информативности методики мы использовали перекись водорода в качестве индуктора активных форм кислорода *in vitro*. Эксперименты показали, что при действии 50 мкМ перекиси водорода разработанный метод позволяет регистрировать возникновение (0.95 ± 0.3 повреждений в ПЦР-продукте размером 5061 п.н. и 1.09 ± 0.3 в ПЦР-продукте размером 10070 п.н.). Таким образом, данная методика достаточно информативна для определения количества повреждений митохондриальной ДНК, вызываемых активными формами кислорода.

В условиях *in vivo* происходит репарация окислительных повреждений ДНК. Однако при старении организма система репарации ДНК работает менее эффективно, в связи с этим, наблюдается повышенное число повреждений ДНК (Sedelnikova et al., 2010). В первую очередь увеличивается число повреждений митохондриальной ДНК, из-за ее пространственной близости к основному источнику внутриклеточных активных форм

кислорода – дыхательной цепи (Lin et al, 2011). Поэтому было проведено предварительное исследование влияния возраста птиц на уровень стабильности митохондриальной ДНК.

В качестве материала для реализации данной задачи использовали полученную ранее ДНК (концентрация 5 нг/мкл) птиц трех возрастных групп (76, 330 и 458 суток). Используя метод количественной ПЦР, нами были количественно определены короткие (271 п.н.) и длинные (10070 п.н.) ПЦР-продукты. Для каждой ПЦР реакции использовали одинаковое количество ДНК (10 нг). Следует отметить, что метод флуориметрической оценки содержания ДНК в растворе позволяет измерить только концентрацию общей ДНК - ядерной и митохондриальной. Поэтому для каждого образца число коротких ПЦР-продуктов использовали в качестве внутреннего стандарта копийности мтДНК, связи с чем, первичные значения концентраций длинных ампликонов нормализовали по числу коротких фрагментов с учетом эффективности реакций.

В результате были получены следующие нормализованные концентрации длинных ПЦР-продуктов: 76 суток – 51.3 ± 13.9 нг/мкл, 330 суток – 20.4 ± 2.8 нг/мкл и 458 суток – 22.7 ± 4.8 . Следовательно, наименьшее количество повреждений мтДНК выявлено у птиц возрастом 76 суток, а наибольшее - возрастом 330 суток. Следует подчеркнуть, что отличия между значениями показателя для группы 76 суточных птиц и группами 330 и 458 суточных птиц статистически значимы, тогда как различия в количестве повреждений мтДНК у 330- и 458-суточных птиц находятся в пределах статистической погрешности. Таким образом, методика определения стабильности ДНК с помощью количественной ПЦР достаточно информативна для определения возрастных изменений показателя, однако с ограничением на поздних стадиях онтогенеза.

Было проведено исследование фоновых значений стабильности митохондриальной ДНК у 20 особей в каждой группе. Получены следующие нормализованные концентрации длинных ПЦР-продуктов: контрольная группа – 24.5 ± 10.5 нг/мкл, I группа – 19.6 ± 4.9 нг/мкл, II группа – 25.9 ± 11.0 нг/мкл, III группа – 22.9 ± 7.5 нг/мкл (рис 5).

Следовательно, наибольшая стабильность мтДНК выявлена у птиц II группы, а наименьшая у птиц I группы. При этом достоверные отличия обнаружены между контролем и II группой, а также I и II группами.

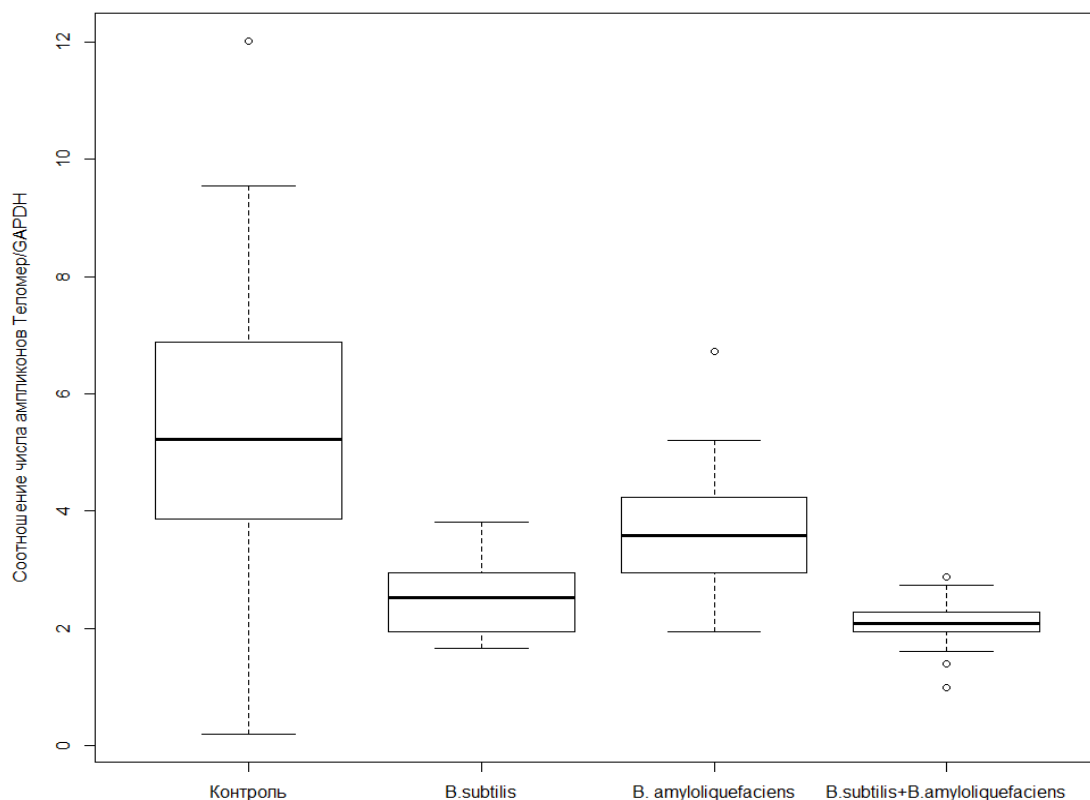


Рис. 5. Относительная длина теломерных участков хромосом в исследованных группах.

Таким образом, в молекулярно-генетических экспериментах отмечено статистически значимое уменьшение относительной длины теломер в I (2.2 раза), II (1.5 раза) и III (2.4 раза) группах по сравнению с контролем, а также статистически значимое снижение уровня повреждения мтДНК во II группе. Насколько эти эффекты соответствуют физиологическим проявлениям старения, будет ясно из дальнейших исследований.

Контроль качества корма. Разработка набора параметров для контроля качества корма.

Все используемые в данном проекте корма и кормовые добавки проходят проверку по параметрам, характеризующим их питательную ценность и токсикологический статус в соответствии с ГОСТ 18221-99 «Комбикорма полнорационные для сельскохозяйственной птицы. Технические условия», а также микробиологическую безопасность в соответствии с «Правилами бактериологического исследования кормов»

Осуществляются все необходимые профилактические мероприятия (Комарова, 2013; Турицына, Донкова, 2010; Тутельян, 2004.)

Тем не менее, стандартные параметры безопасности кормов не перекрывают всего спектра потенциальных токсинов и не учитывают возможности явлений синергизма. Поэтому, набор параметров для контроля качества корма, используемого в исследовательских проектах, связанных с повреждением ДНК, должен быть дополнен тестами на генотоксичность.

Была использована тест-система, основанная на бактериальных LUX-биосенсорах (Котова и др., 2009). Клетки биосенсоров содержат гибридные плазмиды с lux-генами бактериальной люциферазы, находящимися под контролем индуцируемых стрессовых промоторов, активирующихся в ответ на повреждение ДНК или другой, интересующий исследователя фактор. Количественная оценка уровня повреждений происходит за счет измерения уровня биoluminesценции. Подобный тест позволяет не только оценить уровень повреждения ДНК, но и степень окислительного стресса, если повреждающий фактор является одновременно и прооксидантом.

Экстракцию потенциальных генотоксинов и постановку собственно тестирования проводили по методу (Сазыкина и др., 2012). Исследование показало, что два образца корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и КАТМІРА 1933, отобранные 6.10.2016 (образцы 1 и 2, соответственно), не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов.

Следующим этапом была проверка на мутагенность с помощью теста Эймса с метаболической активацией (Mortelmans, Zeiger, 2000). Было обнаружено, что метаболическая активация при использовании коммерческого препарата S9 неэффективна (табл. 13). В то же время гомогенат печени крыс успешно активировал стандартный мутаген – 2 –аминоантрацен (число колоний составило 2000 ± 56 в опыте против 16 в контроле для штамма *Salmonella typhimurium* TA98, и 1900 ± 44 против 111 ± 19 для штамма *Salmonella typhimurium* TA100, т.е., наблюдалось усиление уровня мутагенеза на 2 порядка). Таким образом актуальной задачей следующих этапов проекта является разработка протокола получения активированной S-9 фракции из печени кур.

Таблица 13 – Сравнение эффективности метаболической активации с использованием коммерческого лиофилизата S9 и гомогената печени крыс

Штамм <i>Salmonella typhimurium</i>	Образец	Среднее число колоний на чашках	
		Лиофилизат (коммерческий препарат)	Гомогенат (препарат ИОГЕН)
TA98	DMSO	16 ± 2	16 ± 5
	2-аминоантрацен (50 мкг/мл)	16 ± 3	2000 ± 56

TA100	DMSO	111±14	110±17
	2-аминоантрацен (50 мкг/мл)	111±19	1900±44

Оценку мутагенности корма проводили по методике, модифицированной с учетом полученных данных, на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100.

Опыт ставили в трех повторностях. На чашку вносили 50 мкл суточной культуры *Salmonella typhimurium* и 50 мкл спиртового экстракта образца корма. В качестве отрицательного контроля использовали этанол, в качестве положительного - азид натрия в концентрации 100 мкг/мл.

В результате при действии спиртового экстракта корма не наблюдалось статистически достоверного усиления уровня мутагенеза, тогда как положительный контроль демонстрировал обычное для данного теста усиление уровня мутагенеза на 2 порядка (2000±56 колоний на чашку в опыте против 68±4 в контроле) (табл. 14).

Таблица 14 – Результаты теста Эймса на штаммах TA98 и TA100, среднее число колоний.

Группы	TA100	TA98
Этанол, контроль	68±4	25±5
2-аминоантрацен (50 мкг/мл)	2000±56	984±42
Экстракт корма 1	47±19	18±3
Экстракт кормовой добавки (2)	57±19	23±3

Таким образом, можно заключить, что изученные образцы корма не содержат генотоксинов и мутагенов.

Список использованных источников

1. Викторов, П. И. Методика и организация зоотехнических опытов / П. И. Викторов, В. К. Минькин. – М.: Агропромиздат, 1991. – 112 с.
2. ГОСТ 18221-99 «Комбикорма полнорационные для сельскохозяйственной птицы. Технические условия».
3. Калашников, А.П. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных / А.П. Калашников, В.И. Фисинин, В.В. Щеглов [и др.]. – М., 2003. – 456 с.
4. Комарова З.Б. Научно-практическое обоснование использования новых кормовых добавок при производстве конкурентоспособной мясной и яичной продукции. Дисс. докт. сельхоз. наук. – Волгоград, 2013.

5. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса//Биотехнология. – 2009. - №6. - С.16-25.
6. Кощаев А.Г. Здоровье животных – основной фактор эффективного животноводства / А.Г. Кощаев, В.В. Усенко, А.В. Лихоман // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – №05(099). - С. 1431-1442.
7. Методические рекомендации «Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных» (рег. № 13-5-02/1043 от 11.05.2004)
8. Методические указания по организации и проведению НИР. – М, 2013 г.
9. Овсянников, А.И. Основы опытного дела в животноводстве / А.И. Овсянников. – М.: Колос, 1976. – 134 с.
10. Памирский И.Э. Анализ степени структурной и функциональной однотипности поливалентного ингибитора протеаз, содержащегося в поджелудочной железе животных, и соевого ингибитора трипсина. Дисс. канд. биол. наук. – Благовещенск, 2009.- 117 с.
11. Петенко, А И. Использование полножирной сои в кормлении цыплят-бройлеров / А И Петенко, А.Г Кощаев, Д С Волченко, ЕВ Якубенко// ВетеринарияКубани. – 2005. – №5. – С. 6–7.
12. Празднова Е.В., Мазанко М.С, Золотухин П.В., Харченко Е.Ю., Чистяков В.А., Арутюнов В.А., Козина Л.С. Роль остатка лизина в антиоксидантной и ДНК-протекторной активности олигопептидов//Успехи геронтологии. – 2016. – №5 (в печати)
13. Сазыкина М. А., Чистяков В. А., Сазыкин И. С. Генотоксичность донных отложений р. Дон (2001–2007 гг.) //Водные ресурсы. – 2012. – Т. 39, № 1 – С. 92-98.
14. Скулачев В. П. Что такое "феноптоз" и как с ним бороться?// Биохимия. - 2012. – 07. – Т. 77. - № 7. – С. 827-846.
15. Турицына Е. Г., Донкова Н. В. Проблемы комплексного применения средств специфической и неспецифической профилактики в промышленном птицеводстве //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2010. – №. 7. – С. 101 -107.
16. Тутельян А.В. Разработка системы оценки иммуностропных препаратов природного и синтетического происхождения на основе анализа взаимосвязи иммунной и антиоксидантной защиты. Диссертация докт. мед. наук. – М, 2004 г.- 220 с.

17. Тутельян А.В., Гапонов А.М., Писарев В.М., Эль-Регистан Г.И. Дормантное состояние микроорганизмов и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи//Терапевтический архив. – 2015. – N 11. – С.103-108.
18. Тутельян А.В., Писарев В.М., Гапонов А.М., Акимкин В.Г. Перспективы научных исследований в области профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи// Эпидемиология и Инфекционные болезни. – 2014. – №2. – С. 45 – 51.
19. Algburi A., Zehm S., Natrebov V., Bren A. B., Chistyakov V., Chikindas M. L. Subtilisin prevents biofilm formation by inhibiting bacterial quorum sensing// Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2016. (в печати)
20. Algburi, A., Volski, A. and Chikindas, M.L. Natural Antimicrobials Subtilisin and Lauramide Arginine Ethyl Ester (LAE) Synergize with Conventional Antibiotics Clindamycin and Metronidazole against Biofilms of *Gardnerella vaginalis* but Not against Biofilms of Healthy Vaginal Lactobacilli //Pathogens and disease. – 2015. – T. 73. – №. 5. – C. fiv018.
21. Asgari F., Madjd Z., Falak R., Bahar M.A., Nasrabadi M.H., Raiani M., Shekarabi M. Probiotic feeding affects T cell populations in blood and lymphoid organs in chickens// Benef Microbes. – 2016. – 28. – P. 1-8.
22. Cava V. L. et al. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics //International journal of antimicrobial agents. – 2015. – T. 46. – №. 5. – C. 494-501.
23. Cawthon R. M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucleic Acids Research. – 2002. – Vol. 30. – № 10.
24. Chikindas ML. Probiotics and antimicrobial peptides: the creatures' and substances' future in the twenty-first century: an opinion letter. Probiotics Antimicrob Proteins. – 2014. – 6(2). – p. 69 – 72.
25. Chistyakov V. et al. Poultry-beneficial solid-state *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 fermented soybean formulation //Bioscience of microbiota, food and health. – 2015. – T. 34. – №. 1. – C. 25–28.
26. Chistyakov V. et al. Poultry-beneficial solid-state *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 fermented soybean formulation //Bioscience of microbiota, food and health. – 2015. – T. 34. – №. 1. – C. 25.
27. Colagiorgi A. et al. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix //Microorganisms. – 2016. – T. 4. – №. 3. – C. 22.

28. Cox C. M., Dalloul R. A. Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in ovo application //Beneficial microbes. – 2014. – T. 6. – №. 1. – C. 45-52.
29. Criscuolo F., Bize P., Nasir L., Metcalfe N. B., Foote C. G., Griffiths K., Gault E. A., Monaghan P. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres // Journal of Avian Biology. – 2009. – Vol. 40 – pp. 342-347.
30. Gil M. E., Coetzer T. L. Real-Time Quantitative PCR of Telomere Length // Molecular Biotechnology. – 2004 – Vol. 27. – pp. 169-172.
31. Golovko, G.V., Zipelt, L.I., Karpenko, G.I., Chistyakov, V.A., Sazykina, M.A. and Kolenko, M.A. (2008) Method for Growth of Young Azov-Chernomorskaya Royal Fish in Ponds. RU Patent No. 2376755.
32. Heidinger B. J., Blount J. D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N. B., Monaghan P., Telomere length in early life predicts lifespan // PNAS. – 2012. – Vol. 109. – № 5. – pp. 1743–1748
33. Houben J. M. J., Moonen H. J. J., van Schooten F. J., Hageman G. J. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? // Free Radical Biology & Medicine. – 2008. – V. 44. – pp. 235–246.
34. Lin H., Xu H., Liang F.-Q., Liang H., Gupta P., Havey A. N., Boulton M. E., Godley B. F. Mitochondrial DNA Damage and Repair in RPE Associated with Aging and Age-Related Macular Degeneration. // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2011. – Vol. 52. – № 6. – pp. 3521-3529.
35. Lin J., Epel E., Blackburn E. Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging // [Mutation Research](#). – 2012. – Vol. 730. – pp. 85-89.
36. Machado D. et al. Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 6. pp 1528.
37. Mather K. A., Jorm A. F., Parslow R. A., Christensen H. Is Telomere Length a Biomarker of Aging? A Review // Journal of Gerontology: Biological Sciences. – 2011. – Vol. 66 – № 2. – pp. 202–213.
38. Mortelmans K., Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay //Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2000. – T. 455. – №. 1. – C. 29-60.
39. O'Callaghan N. J., Dhillon V. S., Thomas P., Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length // Biotechniques. – 2008. – Vol. 44. – № 6. – pp 807-809.
40. O'Callaghan N. J., Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length // Biological Procedures Online. – 2011. - V. 13.

41. Paul L. Diet, nutrition and telomere length // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2011. – Vol. 22. – pp. 895–901
42. Pessione E., Cirrincione S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines //Frontiers in Microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 876.
43. Prazdnova E. V. et al. DNA- protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B- 1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 //Letters in applied microbiology. – 2015. – T. 61. – №. 6. – C. 549-554.
44. Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Churilov M.N., Mazanko M.S., ... A. Volski. DNA- protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B- 1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933//Letters in Applied Microbiology. – 2015. – T. 61. – №. 6. – C. 549-554.
45. Santos J. H., Mandavilli B. S., Van Houten B. Measuring Oxidative mtDNA Damage and Repair Using Quantitative PCR // Methods in Molecular Biology. – 2002. – Vol. 197. – pp. 159-176.
46. Schoeftner S., Blasco M. A. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2010. – Vol. 21. – № 2. – pp. 186–193.
47. Sedelnikova O. A., Redon C. E., Dickey J. S., Nakamura A. J., Georgakilas A. G., Bonner W. M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2010. – Vol. 704. - pp. 152-159.
48. Sharma V. K., Bearson S. M. D., Bearson B. L. Evaluation of the effects of sdiA, a luxR homologue, on adherence and motility of *Escherichia coli* O157: H7 //Microbiology. – 2010. – T. 156. – №. 5. – C. 1303-1312.
49. Sutyak K. E. et al. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product derived *Bacillus amyloliquefaciens* //Journal of applied microbiology. – 2008. – T. 104. – №. 4. – C. 1067-1074.
50. Wattanavanitchakorn S., Prakitchaiwattana C., Thamyongkit P. Rapid and simple colorimetric method for the quantification of AI-2 produced from *Salmonella Typhimurium* //Journal of microbiological methods. – 2014. – T. 99. – C. 15-21.