

1. Данные мониторинга микрофлоры кур.

Данные по динамике характеристик и параметров микрофлоры ЖКТ.

Методика. Образцы отбирали в клетках, в которых содержатся опытные и контрольные группы кур и петухов, случайным образом в разных частях клетки, помещали в стерильные контейнеры и при температуре +4°C доставляли в лабораторию.

В лаборатории каждый образец тщательно перемешивали, разводили стерильным физраствором 1:9 по массе, и далее готовили ряд последовательных десятикратных разведений. Дальнейшие исследования вели в строгом соответствии с протоколом, приведенным в методических рекомендациях (Выделение и идентификация бактерий..., 2004).

Для выделения бактерий р. *Lactobacillus* использовали среду MRS, для выделения р. *Bifidobacterium* использовали селективный агар для выделения бифидобактерий, для выделения бактерий р. *E.coli* и других колиформ использовали среду Эндо, для выделения р. *Enterococcus* – желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, р. *Stapylococcus* – среду №10, бактерий р. *Salmonella* и *Shigella* – серективный SS-агар. Бактерии р. *Bacillus* выделялись на среде МПА.

Результаты. Данные по микрофлоре ЖКТ птиц представлены в таблице 1.

Таблица 1. Микробиологический состав помёта птиц

Дата отбора проб	Группа			
	контроль ная	I опытная	II опытная	III опытная
<i>Lactobacillus</i>, 10⁷ КОЕ/г				
72 недели	1,2±0,4	1,3±0,2	1,2±0,4	1,3±0,3
82 недели	1,3±0,1	1,2±0,2	1,1±0,2	1,4±0,2
<i>E.coli</i> и колиформы, 10⁷ КОЕ/г				
72 недели	4,8±0,9	7,1±1,1	6,8±1,2	5,3±1,1
82 недели	5,9±1,2	4,9±1,3	5,0±1,0	6,9±1,2
<i>Enterococcus</i>, 10⁶ КОЕ/г				
72 недели	1,0±0,4	1,4±0,6	1,9±0,7	1,1±0,3
82 недели	1,8±0,6	1,6±0,7	1,3±0,6	1,9±0,5
<i>Stapylococcus</i>, 10⁶ КОЕ/г				
72 недели	3,5±0,5	3,3±0,5	2,8±0,3	3,5±0,4
82 недели	3,6±0,4	2,1±0,6	3,0±0,5	3,2±0,5
<i>Bifidobacterium</i>, КОЕ/г				
72 недели	>10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶
82 недели	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶

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

Бактерии р. *Bacillus* не выделялись из исследованных образцов.

Мониторинг микрофлоры птиц показал, что после достижения ими полового созревания микрофлора так же стабилизировалась и далее не изменялась. Достоверных отличий между группами, как и тенденций к изменению параметров, отмечено не было. Внесение в рацион пробиотика не оказало негативного действия на микрофлору птиц.

2. Данные по способности штаммов исходных и армированных вариантов штаммов *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 и *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 к образованию биопленок.

Для определения способности нативных и армированных штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* B-1895 и *B. subtilis* KATMIRA образовывать биоплёнки, был поставлен тест по культивированию статичных биоплёнок в жидкой среде с последующим окрашиванием генцианом фиолетовым (Марданова и др., 2004).

Показано, что все штаммы бактерий рода *Bacillus* образовывали биоплёнки, отличий между армированными и неармированными штамма выявлено не было.

Для более подробного исследования биоплёнок и их сохранности в готовом препарате была проведена электронная микроскопия гранул препарата на микроскопе Tecnaï G2 spirit biotwin. Обработка препарата для микроскопирования велась по стандартной методике: препарат фиксировали в глутаровом альдегиде с использованием четырехокси осмия (SPI Supplies CAS# 20816-12-0), затем пропитывали смесью Epon812 (SPI Supplies 02660-AB) и ацетона, постепенно увеличивая концентрацию Epon, и далее полимеризовали на подложке.

Электронное микроскопирование показало, что бактерии в препарате находятся в состоянии микрочастиц биоплёнки на поверхности клеток сои либо внутри клеток, если оболочка клетки сои была нарушена (например, при перемалывании среды перед сушкой) (рис.1). Бактерии плотно упакованы в матрикс, что и является одним из важнейших признаков биоплёнок.

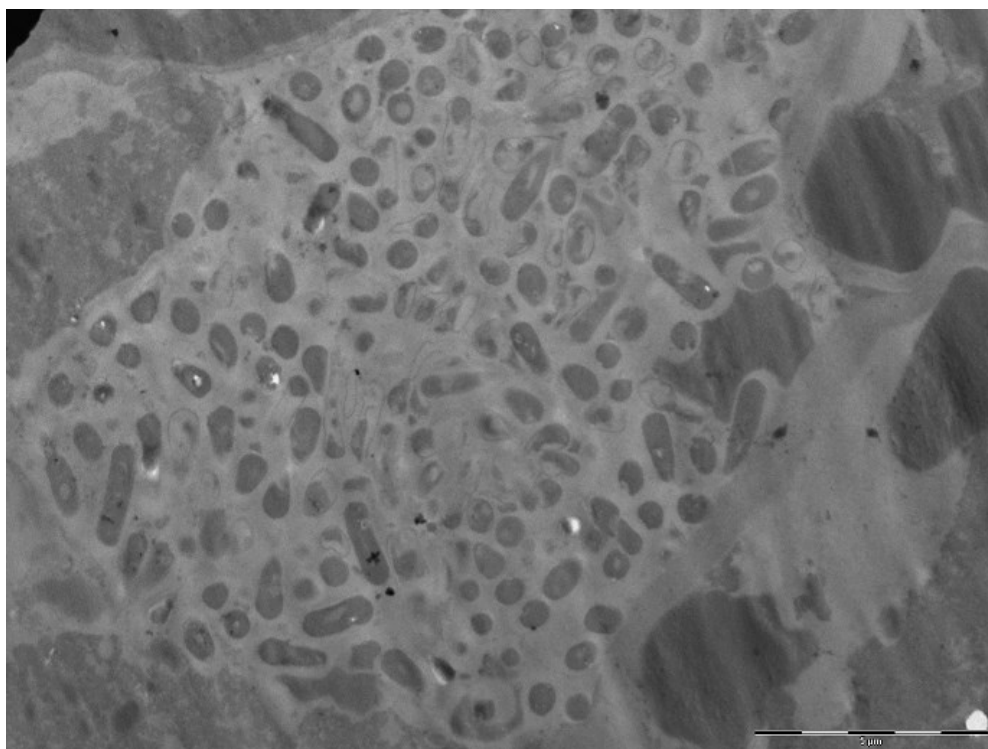


Рис. 1. Бактерии *B. subtilis* KATMIRA между соевых клеток в препарате. Цена деления шкалы – 5 мкм.

3. Оптимизированные параметры твердофазной ферментации пробиотических спорообразующих бацилл (характеристики инокуляции и инкубации, ферментации субстрата, состава и обработки субстрата, гомогенизации и сушки) для будущего масштабирования производства.

Исследованы параметры температурного фактора при инкубации исследуемых бацилл на твёрдом субстрате.

Методика. Объектом исследования был штамм *B. amyloliquefaciens* B-1895.

Для исследования влияния субстрата на рост бактерий *B. amyloliquefaciens* B-1895 определили его на таких дешевых и доступных субстратах, как горох, соя и подсолнечный жмых. В остальных случаях в качестве субстрата использовали сою.

Субстрат замачивали в воде в соотношении 1:1

Для оценки влияния первичной обработки на субстрат сою через три часа замачивания автоклавировали при температуре 120°C 20 минут либо проваривали 40 мин. В остальных случаях после трёхчасового замачивания субстрат автоклавировали при температуре 120°C 20 минут.

Для исследования параметров инокуляции *B. amyloliquefaciens* B-1895 в субстрат вносили в виде споровой массы (выращивание на твёрдой питательной среде LB 5 сут. при 37°C, затем хранение при 4°C 3 сут.), в виде суточной культуры клеток (выращивание на твёрдой питательной среде LB 1 сут. при 37°C), а также в виде суточной культуры, выращенной на жидкой питательной среде (выращенной на жидкой питательной среде LB 1 сут. при температуре 37°C на качалке). В остальных случаях в качестве инокулята использовали суточную культуру *B. amyloliquefaciens* B-1895, выращенную на твёрдой питательной среде LB при 37°C.

Для исследования параметров инкубации инкубация велась при температурах 25°C, 36°C, 42°C, 50°C. В остальных случаях инкубация велась при температуре 42°C.

Твердофазное ферментирование происходило в поддонах, слой субстрата составил 2-3 см, инкубация длилась 24 ч.

Ферментированный субстрат измельчали при помощи мясорубки и высушивали на тех же поддонах, разложив слоем 2-3 см. Для определения влияния температуры на сушку препарат сушили при температурах 30°C, 45°C и 80°C. Во всех остальных случаях препарат сушили при температуре 45°C.

Рост культур оценивали по содержанию жизнеспособных клеток (КОЕ), их количество определяли методом посева серийных разведений на плотную питательную среду (LB).

Для определения наилучших параметров сушки ферментированный субстрат сушили при температуре 30°C, 45°C и 80°C.

Для определения ферментативной активности *B. amyloliquefaciens* B-1895 как показателя способности к усвоению субстрата был проведён ряд тестов.

Для визуального определения протеазной активности *B. amyloliquefaciens* B-1895 и *B. subtilis* КАТМІРА производили посев на агаризованную среду LB с добавлением стерильного молока в объёме 20% от общего объёма среды. О наличии протеиназной активности судили по появлению зон просветления вокруг колоний. Утилизацию крахмала определяли добавлением в среду раствора Люголя, О наличии протеиназной активности судили по появлению зон просветления вокруг колоний.

Результаты. Исследование показало, что отличий между первичной обработкой субстрата путем автоклавирования либо варки обнаружено не было.

Внесение в субстрат бактерий в разных формах (споровой и суточной культуры, на твердом и на жидком субстрате) не оказывало существенного влияния количество КОЕ в конечном продукте ($4,7 \cdot 10^8$ КОЕ/г при внесении споровой культуры, $5,0 \cdot 10^8$ КОЕ/г при внесении суточной культуры и $4,9 \cdot 10^8$ КОЕ/г при внесении жидкой суточной культуры).

Показано, что при температуре 25°C количество выросших бактерий было ниже на 22%, чем при температуре 36 и 42°C ($4,1 \cdot 10^8$ КОЕ/г, $5,2 \cdot 10^8$ КОЕ/г, $4,9 \cdot 10^8$ КОЕ/г соответственно) и наблюдался рост посторонней микрофлоры (грамматрицательные палочки, гармположительные кокки). При температуре 36°C скорость роста бактерий была максимальной, однако, также наблюдался рост посторонней микрофлоры, обусловленной нестерильными условиями в процессе культивации. При температуре 42°C посторонней микрофлоры обнаружено не было. При температуре 50°C рост бактерий *B. amyloliquefaciens* B-1895 на субстрате отсутствовал.

Среди представленных субстратов наилучший рост был продемонстрирован на горохе – $5,6 \cdot 10^8$ КОЕ/г, на сое количество бактерий составило $4,7 \cdot 10^8$ КОЕ/г, на подсолнечном жмыхе – $0,3 \cdot 10^8$ КОЕ/г.

Сушка при 30°C заняла 5 сут, за это время в субстрате развилась посторонняя микрофлора (грамматрицательные и грамположительные палочки, гармположительные кокки). При температуре 45°C сушка заняла 3 сут, количество бактерий составило $4,9 \cdot 10^8$ КОЕ/г, посторонней микрофлоры не наблюдалось. При температуре 80°C сушка заняла 2 сут, однако количество бактерий составило $3,1 \cdot 10^8$ КОЕ/г, что связано с дорастанием бактерий на

Показано, что обе исследуемые бактерии обладают амилазной и протеазной активностью, что позволяет им ферментировать предложенный субстрат. Горох и соя богаты крахмалом, и наличие амилазы, видимо, является причиной хорошего роста бактерий на этих субстратах.

4. Нарботка партий препаратов пробиотических штаммов бактерий для завершения эксперимента.

В 2018 году на опытном участке, по методике, подробно описанной в отчете за 2016 год, было проведено по 4 выработки препаратов каждого штамма. Выход сухого препарата за одну выработку составил 750±50 г, содержание жизнеспособных клеток использованных штаммов составило $4-8 \cdot 10^9$ КОЕ в одном грамме сухого препарата.

5. Коллекция пробиотических бактерий – представителей естественной микрофлоры кур и данные по их идентификации.

Для получения коллекции пробиотических микроорганизмов были отобраны штаммы бактерий, выделенные из кишечника птиц.

Образцы экскрементов отбирали в клетках, в которых содержатся опытные и контрольные группы кур и петухов, случайным образом в разных частях клетки, помещали в стерильные контейнеры и при температуре +4°C доставляли в лабораторию. В лаборатории каждый образец тщательно перемешивали, разводили стерильным физраствором 1:9 по массе, и далее готовили ряд последовательных десятикратных разведений. Бактерии выделяли на твердых и полужидких питательных средах в строгом

соответствии с протоколом, приведенным в методических рекомендациях (Выделение и идентификация бактерий..., 2004).

Для выделения бактерий р. *Lactobacillus* использовали среду MRS, для выделения р. *Bifidobacterium* использовали селективный агар для выделения бифидобактерий, для выделения р. *Enterococcus* – желчно-эскулиновый агар с азидом натрия.

Было получено 14 штаммов микроорганизмов, относящихся к родам *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*.

Идентификацию проводили методом масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Лейпциг, Германия) с программным обеспечением Biotyper (версия 3.0) (Bruker Daltonics). Исходные спектральные данные были автоматически проанализированы программным обеспечением MALDI BioTyper (Bruker Daltonics) с использованием библиотеки, содержащей 5989 спектров с настройками по умолчанию (база данных была обновлена производителем в 2016 году).

Для проведения масс-спектрометрии MALDI-TOF бактерии культивировали 24 часа на твёрдой питательной среде (см. выше) при температуре 30° С в течение для получения достаточного количества биомассы.

Идентификацию проводили путем нанесения небольшого количества биомассы стерильным наконечником пипетки на стальной планшет MSP 96 (Bruker Daltonics).

На тонкий слой бактерий наносили 1 мкл матрицы (насыщенный раствор α-циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50% ацетонитрил-2,5% трифторуксусной кислоте) и давали высохнуть при комнатной температуре. Полученные спектры были проанализированы с помощью программного обеспечения BioTyper. Согласно инструкции изготовителя, идентификация считалась действительной, когда оценка превышала 2,0.

Список штаммов в коллекции:

Lactobacillus salivarius
Lactobacillus salivarius
Lactobacillus salivarius
Lactobacillus aviarius
Lactobacillus crispatus
Lactobacillus crispatus
Lactobacillus crispatus
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus delbrueckii
Lactobacillus johnsonii
Enterococcus durans
Bifidobacterium ovatus
Bifidobacterium ovatus
Bifidobacterium bifidum

Все штаммы сохранены в системе CRYOBLOCK (MAST Group Ltd., Великобритания) при температуре -20°С.

6. Данные по химической природе веществ, обеспечивающих ДНК-протекторную и антиоксидантную активность пробиотических препаратов, полученные с использованием хромато-масс спектрометрии.

Было произведено предварительное разделение фракций культуральной жидкости с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra на 3, 10, 30 и 100 кДа. Было установлено, что ДНК-протекторная активность штамма *B.amyloliquifaciens* B-1895 сохраняется в фракции размером <3 кДа и даже незначительно увеличивается после пропускания через фильтр, по-видимому, за счет повышения концентрации действующего вещества в растворе и удаления возможных ингибиторов (активность нефiltrованной культуральной жидкости составила $50,95 \pm 2,1$ %, активность выделенной фракции - $61,02 \pm 5,3$ %). Активность штамма *B.subtilis* Katmira 1933 сохраняется в фракции с размером молекул 3-10 кДа ($55,58 \pm 4,2$ % в нефiltrованном препарате и $60,11 \pm 6,1$ % в выделенной фракции), тогда как в фракции с размером молекул <3 кДа активность снижается ($33,0 \pm 0,8$ %) (рис.2).

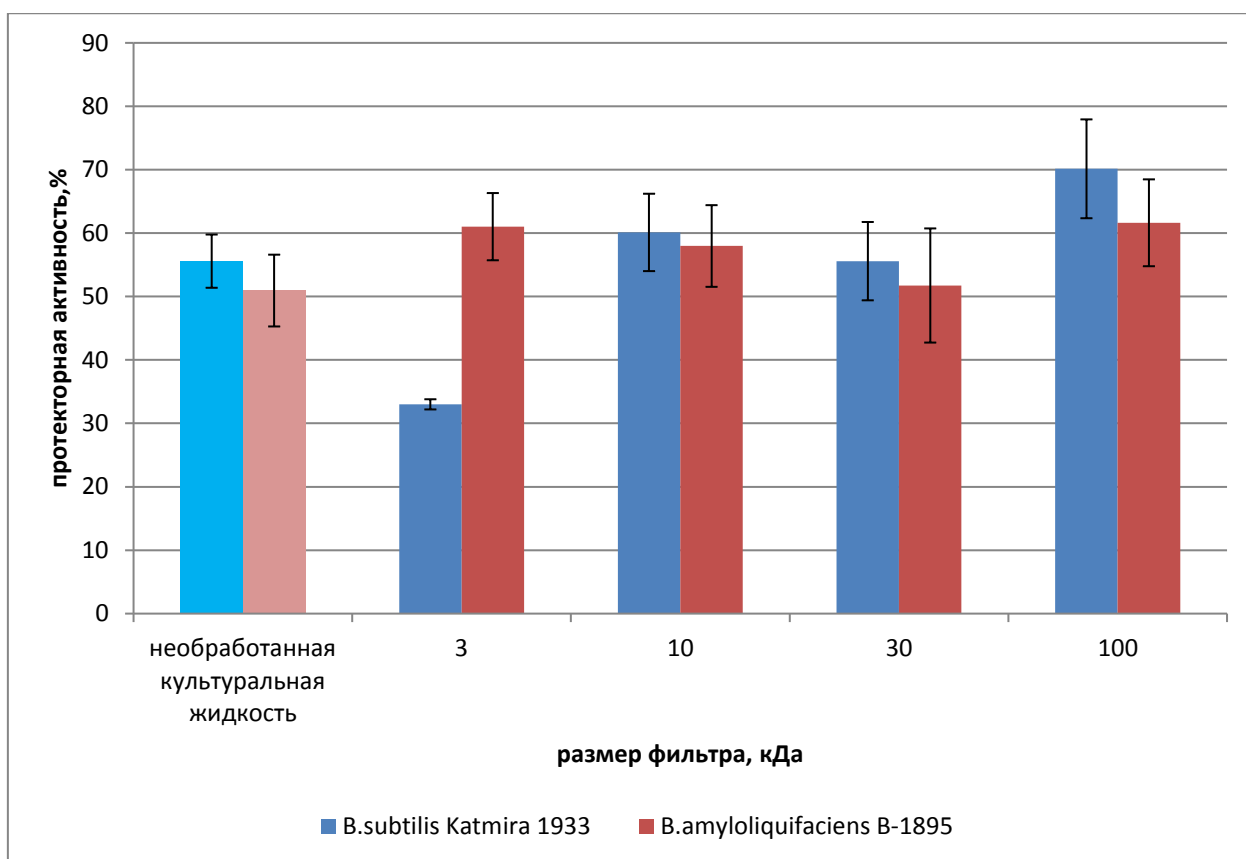


Рисунок 2. Протекторная активность фракций метаболитов.

Было проведено препаративное выделение соответствующих фракций на хроматографе BioLogicLP с фракционным коллектором BioFrac (BioRad). Анализ полученных препаратов проводили путем масс-спектрометрии с разделением по молекулярным ионам методом электрораспыления в вакууме (электроспрей) с использованием масс-спектрометра DECA XP MAX (Thermo Electron). В фракции размером 3-10 кДа были зарегистрированы ионы с m/z 876, 836, 577 и 390. Состав фракции менее 3 кДа требует анализа с применением более чувствительных методов.

На предыдущих этапах было установлено, что действующее вещество культуральной жидкости, обладающее целевой активностью, не разрушается под действием температуры, протеиназы и РНКазы. Установленные размеры молекул позволяют с уверенностью заключить, что целевым веществом могут быть короткие

олигопептиды, являющиеся вторичными метаболитами клеток бацилл (Yang et al., 2017) либо результатами ферментации субстрата (He et al., 2012).

7. Данные мониторинга физиологических параметров опытных и контрольной групп птиц, включая параметры яйценоскости и качества спермы в период обусловленного возрастом угасания физиологических функций.

Эксперимент продлился 82 недели, длительность была обусловлена требованиями к производственной технологии. Тенденции, установленные нам на предыдущем этапе исследования, сохранились и получили развитие в 2018 г. В возрасте 81 недели вес у разных экспериментальных групп достоверно ($P < 0,05$) превышал таковой по сравнению с контролем: в группе I на 4,31%, в группе II на 3,86% и в группе III на 0,83% (Таблица 2).

Таблица 2. Динамика живой массы подопытной птицы (финальный этап), г

Возраст, нед.		S/t	Группа			
			контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
1	2	3	4	5	6	7
65	кур	1975	2131±17,15	2270±12,31	2227±15,67	2212±13,11
	пет	2735	3037±14,18	3139±14,89	3079±10,12	3089±10,26
69	кур	1975	2148±16,13	2274±15,04	2243±18,13	2234±17,61
	пет	2740	3059±19,58	3164±23,18	3115±17,46	3107±18,18
73	кур	1980	2163±18,63	2285±21,18	2259±19,79	2243±16,84
	пет	2745	3074±24,17	3180±22,39	3180±23,29	3121±19,92
77	кур	1990	2205±17,49	2307±19,31	2304±21,18	2267±22,47
	пет	2780	3102±21,17	3220±24,08	3205±23,11	3145±19,89
81	кур	1990	2230±19,65	2326±22,07	2316±22,37	2284±17,15
	пет	2780	3130±22,32	3240±18,70	3216±24,13	3156±15,94

Различия в развитии репродуктивных органов у несушек, обнаруженные в начале эксперимента, сохранились на протяжении всей жизни птиц (Таблица 3).

Таблица 3. Развитие внутренних и репродуктивных органов кур перед убоем (возраст 82 недели), г (n=3)

Показатель	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Живая масса	2230±19,65	2326±22,07**	2316±22,37* *	2284±17,15
Масса сердца	10,70±0,16	12,09±0,18**	11,81±0,13**	11,65±0,21*
Масса печени	45,06±0,79	49,68±0,81**	49,44±0,88*	47,33±0,67*
Масса селезенки	4,25±0,27	4,89±0,31	4,63±0,19	4,41±0,33

Масса мышечного желудка	45,27±1,06	50,73±1,13*	50,21±1,11*	48,84±1,08
Масса легких	9,11±0,18	10,62±0,19**	10,17±0,21*	9,67±0,14*
Масса яйцевода	68,05±1,28	80,25±1,17***	73,69±1,21*	73,48±1,19*
Длина яйцевода	71,15±0,57	77,90±0,81***	75,20±0,49**	74,60±0,43**
Количество сформированных фолликулов	4	8	6	5

В конце эксперимента, несмотря на возраст кур (82 недели), яичник и яйцевод были в отличном состоянии, особенно в экспериментальных группах. Вес яйцевода кур разных экспериментальных групп достоверно ($P < 0,05$) превышал контроль: в группе I на 17,93%, группе II - на 8,29%, в III группе на 7,98%. Длина яйцевода также превышала контрольный показатель – на 9,49%, 5,69% и 4,85% соответственно.

Масса семенников петухов экспериментальных групп была выше контрольной: в группе I на 9,44% ($P < 0,01$), группе II на 8,77% ($P < 0,01$), а в группе III - на 5,09% ($P < 0,05$), что подтверждает высокое оплодотворение инкубированных яиц в течение всего эксперимента. Состояние внутренних органов петухов, включая печень, не имело никаких патологических изменений (Таблица 4).

Таблица 4 – Развитие внутренних органов петухов (возраст 82 недели), г (n=3)

Показатель	Группа			
	контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Живая масса	3130±22,32	3240±18,70	3216±24,13	3151±15,94
Масса сердца	17,34±0,14	18,63±0,15	18,03±0,13	17,92±0,11
Масса печени	61,37±1,22	69,84±1,19	69,19±1,39	64,51±1,13
Масса селезенки	7,03±0,35	7,79±0,41	7,62±0,29	7,47±0,41
Масса мышечного желудка	69,25±1,47	75,12±1,51	74,81±1,18	72,13±1,07
Масса легких	10,81±0,33	12,47±0,27	12,04±0,23	11,67±0,16
Масса семенников	35,79±0,61	39,17±0,52	38,93±0,44	37,61±0,32

Гематологические показатели и биохимический состав крови подопытной птицы находились на уровне нормативных показателей. Во все изучаемые возрастные периоды содержание гемоглобина в крови ремонтного молодняка опытных групп, как курочек, так и петушков превышала контроль. К концу эксперимента у кур экспериментальных групп наблюдалось значительное увеличение содержания общего белка в сыворотке крови по сравнению с контролем: на 12,68% ($P < 0,01$) в группе I, 9,16% ($P < 0,01$) в группе II и 6,20% ($P < 0,05$) в группе III. Аналогичная тенденция наблюдалась и у петухов с увеличением на 9,95% ($P < 0,01$), 6,57% ($P < 0,05$) и 5,62% ($P < 0,05$) соответственно. Можно отметить, что содержание эритроцитов во всех подопытных группах несколько снизилась, однако по сравнению с контролем этот показатель оказался выше в опытных группах (таблица 5).

Таблица 5. Гематологические показатели птицы перед убоем (возраст 82 недели) (n=3)

Показатель	Пол	Группа
------------	-----	--------

		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Эритроциты, 10^{12} /л	кур	2,84±0,07	297±0,09	2,92±0,08	2,89±0,06
	пет	3,01±0,08	3,17±0,07	3,14±0,07	3,12±0,08
Лейкоциты, 10^9 /л	кур	34,15±1,29	35,69±0,83	35,11±1,35	34,84±0,84
	пет	30,16±0,61	32,21±0,79	31,64±0,48	31,10±0,67
Гемоглобин, г/л	кур	132,51±1,32	138,42±1,49*	133,12±1,51	132,64±1,27
	пет	165,57±1,87	170,94±1,91	169,17±2,13	169,08±2,48

Уровень глюкозы в сыворотке крови птиц во все возрастные периоды был выше контрольных уровней. Приведенные выше данные могут косвенно указывать на положительный эффект тестируемых штаммов бацилл на скорость метаболизма в организме тестируемых птиц.

Препараты оказывали умеренно стимулирующий эффект на обмен кальция и фосфора в сыворотке крови кур и петухов родительской группы (Таблица 6). Результаты исследований показали, что содержание кальция и фосфора варьируется как по возрасту, так и между группами, но их значения находятся в пределах физиологических норм.

Таблица 6. Содержание кальция и фосфора в сыворотке крови кур и петухов опытных групп на 82 неделе опыта.

Группа	Куры		Петухи	
	Кальций, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л	Кальций, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л
Контроль	2.04±0.77	2.92±0.05	2.06±0.08	2.78±0.06
I	2.11±0.08	3.05±0.07	2.09±0.09	2.93±0.05
II	2.09±0.09	2.76±0.05	2.09±0.07	2.83±0.04
III	2.06±0.06	2.69±0.06	2.07±0.07	2.67±0.08

Содержание общего белка практически не изменилось по сравнению с предыдущими исследованиями, однако в опытных группах кур наблюдается достоверное превышение этого показателя по отношению к контролю в I группе на 12,68 (P<0,01), во II – на 9,16 (P<0,01) и в III – на 6,20% (P<0,05); петухов – на 9,95 (P<0,01), 6,57 (P<0,05) и 5,62% (P<0,05) соответственно группам (таблица 7).

Таблица 7. Биохимический состав крови птицы перед убоем (возраст 82 недели) (n=3)

Показатель	Пол	Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Общий белок, г/л	кур	65,15±0,87	73,41±0,94	71,12±0,61	69,19±0,59
	пет	82,04±1,13	90,20±1,27	87,43±1,09	86,65±0,86
Альбумины, г/л	кур	19,63±1,07	25,41±1,11	23,90±0,91	22,05±0,65
	пет	24,84±0,83	29,82±0,57	26,93±0,47	26,30±0,71
Относительные, %	кур	30,13±0,51	34,61±0,63	33,61±0,73	31,87±0,49
	пет	30,28±0,77	33,06±0,81	30,80±0,69	30,35±0,52
Глобулины, г/л	кур	45,52±0,35	48,00±0,29	47,22±0,31	47,14±0,27
	пет	57,20±0,42	60,38±0,37	60,50±0,34	60,35±0,29
Относительные, %	кур	69,87±0,49	65,39±0,53	66,39±0,57	68,13±0,47
	пет	69,72±0,66	66,94±0,61	69,20±0,71	69,65±0,39

Белковый индекс	кур	0,41	0,53	0,51	0,47
	пет	0,46	0,41	0,44	0,46
Мочевина, ммоль/л	кур	2,81±0,09	3,76±0,11	3,63±0,13	3,49±0,15
	пет	2,63±0,10	3,58±0,12	3,54±0,14	3,47±0,11
Глюкоза, ммоль/л	кур	6,65±0,12	7,19±0,13	6,97±0,08	6,89±0,09
	пет	4,66±0,16	4,97±0,17	4,88±0,11	4,82±0,14
Кальций, ммоль/л	кур	2,04±0,77	2,11±0,08	2,09±0,09	2,06±0,06
	пет	2,06±0,08	2,09±0,09	2,09±0,07	2,07±0,07
Фосфор, ммоль/л	кур	2,92±0,05	3,05±0,07	2,76±0,05	2,69±0,06
	пет	2,78±0,06	2,93±0,05	2,83±0,04	2,67±0,08

Наблюдается снижение уровня альбуминовой фракции. По всей вероятности, это связано с некоторым замедлением обмена веществ, в связи с возрастом птицы и достаточно высокой продуктивностью, которая превышает в опытных группах нормативные показатели данного кросса птицы. Известно, что альбумины трансформируются в белок яиц и, как следствие, наблюдается снижение альбуминов в сыворотке крови кур в пределах физиологической нормы. Однако в опытных группах содержание альбуминов оказалось выше контроля в I опытной группе на 29,44 ($P<0,05$), во II – на 21,75 ($P<0,05$) и в III – на 12,33%. Аналогичная картина наблюдается и у петухов, особенно в I опытной группе, где уровень эритроцитов превысил контроль на 20,05 ($P<0,01$), а во II и III группах – на 8,41 и 5,88% соответственно группам.

Содержание мочевины находилось на уровне физиологической нормы и большой разницы с предыдущими показателями не обнаружено. В опытных группах как кур, так и петухов содержание мочевины в сыворотке крови превышало контроль: у кур – на 33,81 ($P<0,01$), 24,74 ($P<0,01$) и 19,93% ($P<0,05$); у петухов – на 26,50 ($P<0,01$), 29,09 ($P<0,01$) и 22,62% ($P<0,01$) соответственно группам.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что изучаемые добавки положительно влияют на обмен веществ птицы родительского стада и, в частности, белковый.

Анализ состава яиц.

Наблюдалась тенденция к увеличению содержания белка в белковой части яиц кур-несушек экспериментальных групп на 0,39% в группе I, на 0,24% в группе II и на 0,29% в группе III и в желтке на 1,42%, 1,48. % и 1,40% соответственно (Таблица 8). Содержание жира в белке было практически на уровне, наблюдаемом в контрольной группе, а в желтке оно превышало контроль на 0,38%, 0,062% и 0,071% соответственно. Содержание каротиноидов в желтке яиц, полученных от кур опытных групп, превысило контроль на 11,87 ($P<0,001$), 11,68 ($P<0,001$) и 11,74% ($P<0,01$). Увеличение содержания витаминов в экспериментальных группах по сравнению с контролем наблюдалось во всех группах, в пределах от 10 до 20% с аналогичными результатами в группах для различных рассматриваемых витаминов (таблица S3). Тем не менее, была отмечена заметная разница в уровнях витамина А с увеличением на 20,56% ($P<0,001$) в группе I, 16,29% ($P<0,001$) в группе II и 18,56% ($P<0,001$) в группе III.

Таблица 8. Изменения химического состава инкубационных яиц, % от общего сухого вещества.

	Группа			
	Контроль	I	II	III
Белок				
Всего сухого вещества	12.026±0.17	12.892±0.21	12.424±0.12	12.363±0.19
В том числе:				
белка	10.605±0.17	11.414±0.18	10.957±0.11	10.924±0.18
Жир	0.020±0.004	0.022±0.005	0.022±0.003	0.021±0.003
углеводы	0.886±0.07	0.922±0.08	0.920±0.09	0.894±0.06
Желток				
Всего сухого вещества	50.412±0.32	52.429±0.29	52.115±0.24	52.104±0.42
В том числе:				
белка	15.820±0.23	17.325±0.37	17.239±0.30	17.272±0.28
Жир	32.322±0.012	32.885±0.026	32.664±0.028	32.623±0.031
углеводы	1.151±0.005	1.164±0.006	1.157±0.007	1.155±0.008

Содержание кальция в I опытной группе оказалось выше контроля на 40,94 ($P<0,05$), II опытной – на 27,0 и в III – на 21,34%, что подтверждает высокие результаты инкубации, несмотря на снижение кальция в сыворотке крови кур и яичной скорлупе яиц.

Концентрация фосфора также выше контроля в опытных группах на 52,40 ($P<0,05$), 42,64 и 42,28% соответственно, что также характеризует качество инкубационных яиц, и говорит о том, что у кур-несушек опытных групп не снизился уровень минерального обмена.

Достоверная разница наблюдается по содержанию стронция в яйцах между контролем и опытными группами. Так, в I опытной группе превышение составило 43,24% ($P<0,05$), II и III опытных групп - 32,94%.

Наблюдается тенденция увеличения алюминия, меди, железа, калия, магния, марганца, цинка.

Однако содержание натрия снизилось в I опытной группе на 31,56; во II опытной – на 31,76 и в III опытной – на 32,16%.

В I опытной группе наблюдается достоверное повышение ряда аминокислот относительно контроля: аспарагиновой кислоты на 29,09 ($P<0,001$), аргинина – на 14,94 ($P<0,05$), аланина – на 15,46 ($P<0,01$), изолейцина – на 39,05 ($P<0,001$), лейцина – на 10,26 ($P<0,05$), лизина – на 19,35 ($P<0,01$) и пролина – на 37,21% ($P<0,001$).

В III опытной группе, где птица получала смешанную кормовую добавку (штамм №1+ штамм №2), также наблюдается увеличение содержания ряда аминокислот по отношению к контролю: аспарагиновой кислоты на 16,37 ($P<0,05$), аргинина – на 49,23 ($P<0,001$), аланина – на 21,65 ($P<0,01$), цистина – на 15,38 ($P<0,05$), метионина – на 12,07 ($P<0,05$), изолейцина – на 24,76% ($P<0,001$).

Во II опытной группе достоверное превышение по сравнению с контролем наблюдалось только по содержанию лейцина и лизина на 12,82 ($P<0,05$) и 14,51% ($P<0,05$).

Следует отметить, что только в III опытной группе наблюдается увеличение содержания серусодержащих аминокислот (цистин, метионин).

Сумма аминокислот яиц I опытной группы составила 12,43г/100г продукта, что на 9,38% выше контроля. Для III группы этот параметр составил 6,63%, а II опытной находилось на уровне контроля.

Яйценоскость. В период с 63 по 82 неделю во всех группах наблюдалось снижение яйценоскости, связанное со старением несушек, однако в группе I и II это снижение происходило медленнее, чем в контрольной и III опытной. На основании полученных данных была построена математическая модель, позволяющая оценить степень этого замедления. На 82 неделе яйценоскость в группах I и II превышала контроль. Наиболее значимый результат наблюдался в I группе (на 4%) (Таблица 9).

Таблица 9. Яйценоскость за весь период эксперимента

Возраст, недели	Контроль		I		II		III	
	Количество яиц	Яйценоскость, %	Количество яиц	Яйценоскость, %	Количество яиц	Яйценоскость, %	Количество яиц	Яйценоскость, %
19	19	4.24	22	4.91	28	6.25	28	6.25
20	81	18.08	78	17.41	82	18.30	80	17.86
21	211	49.61	232	54.33	210	49.18	206	48.24
22	328	76.81	356	83.37	332	77.75	339	79.39
23	374	87.59	380	88.99	372	87.12	379	88.76
24	381	89.23	388	90.87	387	90.63	386	90.39
25	384	89.93	392	91.88	390	91.33	388	90.87
26	394	92.27	398	93.21	397	92.97	397	92.97
27	397	92.97	401	93.91	398	93.21	399	93.24
28	399	93.24	402	94.15	400	93.68	401	93.91
29	397	92.97	404	94.61	402	94.15	403	94.38
30	400	93.68	405	94.85	402	94.15	403	94.38
31	402	94.15	408	95.55	405	94.85	405	94.85
32	404	94.61	409	95.78	406	95.08	406	95.08
33	406	95.08	409	95.78	408	95.55	407	95.32
34	408	95.55	409	95.78	408	95.55	411	96.25
35	408	95.55	410	96.02	408	95.55	412	96.49
36	407	95.32	409	95.78	407	95.32	410	96.02
37	407	95.32	409	95.78	407	95.32	409	95.78
38	406	95.08	408	95.55	407	95.32	407	95.32
39	406	95.08	409	95.78	407	95.32	406	95.08
40	406	95.08	409	95.78	407	95.32	406	95.08
41	405	94.85	407	95.32	406	95.08	405	94.85
42	402	94.15	405	94.85	404	94.61	403	94.38
43	400	93.68	404	94.61	402	94.15	401	93.91

44	399	93.44	402	94.15	401	93.91	400	93.68
45	397	92.97	400	93.68	398	93.21	397	92.97
46	391	91.57	396	92.74	393	92.03	392	91.80
47	385	90.16	391	91.57	389	91.10	387	90.63
48	385	90.16	390	91.33	387	90.63	386	90.40
49	383	89.69	387	90.63	385	90.16	384	89.93
50	382	89.46	388	90.87	384	89.93	383	89.69
51	383	89.69	389	91.10	385	90.16	383	89.69
52	384	89.93	389	91.10	386	90.40	384	89.93
53	382	89.46	387	90.63	386	90.40	383	89.70
54	381	89.23	387	90.63	385	90.16	382	89.46
55	380	88.99	386	90.40	384	89.93	380	88.99
56	379	88.76	384	89.93	383	89.70	380	88.99
57	378	88.52	384	89.93	382	89.46	379	88.76
58	379	88.76	382	89.46	380	88.99	378	88.52
59	377	88.29	382	89.46	379	88.76	378	88.52
60	376	88.01	381	89.23	379	88.76	377	88.29
61	376	88.01	381	89.23	378	88.52	377	88.29
62	377	88.29	383	89.70	380	88.99	378	88.52
63	374	87.59	381	89.23	377	88.29	375	87.22
64	371	86.88	379	88.76	375	87.82	374	87.59
65	369	86.18	375	87.82	371	86.88	370	86.65
66	365	85.48	371	86.88	369	86.18	367	85.95
67	360	84.31	367	85.95	365	85.48	362	84.78
68	352	82.43	361	84.54	357	83.6	354	82.91
69	341	79.86	354	82.9	346	81.03	345	80.79
70	332	77.75	347	81.26	340	79.63	337	78.92
71	324	75.88	339	79.39	327	76.58	325	76.11
72	326	76.35	341	79.86	327	76.58	353	75.64
73	325	76.11	342	80.01	327	76.58	324	75.88
74	326	76.35	342	80.01	329	77.05	325	76.11
75	325	76.11	340	79.63	325	76.11	324	75.88
76	324	75.88	338	79.16	325	76.11	322	75.41
77	320	74.94	335	78.45	322	75.41	320	74.94
78	320	74.94	337	78.92	323	75.64	320	74.94
79	314	73.54	332	77.75	317	74.24	315	73.77
80	312	73.07	330	77.28	315	73.77	314	73.54
81	308	72.13	324	75.88	310	72.6	308	72.13
82	304	71.19	318	74.47	306	71.66	305	71.43

Вылупляемость.

Инкубацию яиц провели еще дважды, и во всех подопытных группах был получен высокий вывод цыплят (таблицы 10, 11).

Таблица 10. Результаты инкубации яиц (возраст птицы 504 дня, вывод 10.01.2018)

Показатель	Группа							
	контрольная		I опытная		II опытная		III опытная	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Заложено яиц в инкубатор	272	100	272	100	272	100	272	100
Оплодотворенность яиц	250	91,91	256	94,12	256	94,12	254	93,38
Отходы инкубации, в т.ч.:								
неоплодотворенные яйца	22	8,09	16	5,88	16	5,88	18	6,62
«кровяное кольцо»	17	6,25	15	5,51	15	5,51	16	5,88
замершие эмбрионы	18	6,62	17	6,25	18	6,62	16	5,88
задохлики	15	5,51	15	5,51	16	5,88	17	6,25
Выведено молодняка, гол.	200	-	209	-	207	-	205	-
Вывод здоровых цыплят, %	-	73,53	-	76,85	-	76,11	-	75,37
Выводимость яиц, %	-	80,00	-	81,64	-	80,86	-	80,71

Результаты четвертой закладки яиц в инкубатор (вывод 10.01.2018) показал, что вывод здоровых цыплят во всех подопытных группах оказался высоким и, даже в контроле превышал нормативные показатели, характеризующие кросс. Так, в I опытной группе вывод здоровых цыплят составил 76,85%, что на 3,32% выше контроля, во II – на 2,58 и в III – на 1,84%. Такие высокие показатели инкубации яиц были достигнуты за счет сохранения оплодотворенности яиц на высоком уровне (с возрастом птицы оплодотворенность яиц, как правило снижается).

Таблица 11. Результаты инкубации яиц (возраст птицы 574 дня, вывод 21.03.2018)

Показатель	Группа							
	контрольная		I опытная		II опытная		III опытная	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Заложено яиц в инкубатор	272	100	272	100	272	100	272	100
Оплодотворенность яиц	247	90,81	253	93,01	252	92,65	251	92,27
Отходы инкубации, в т.ч.:								
неоплодотворенные яйца	25	9,19	19	6,99	20	7,36	21	7,72
«кровяное кольцо»	17	6,25	16	5,88	16	5,88	17	6,25

замершие эмбрионы	18	6,62	15	5,51	17	6,25	18	6,62
задохлики	16	5,88	16	5,88	16	5,88	17	6,25
Выведено молодняка, гол.	196	-	206	-	203	-	199	-
Вывод здоровых цыплят, %	-	72,06	-	75,74	-	74,63	-	73,16
Выводимость яиц, %	-	79,35	-	81,42	-	80,56	-	79,28

Результаты последней, пятой инкубации, где возраст птицы составил 574 дня или 82 недели (вывод 21.03.2018) также были высокими, что нехарактерно для такого возраста птицы. Оплодотворенность в I опытной группе составила 93,01, во II опытной – 92,67 и в III – 92,27%, что является явным влиянием изучаемых добавок в кормлении опытной птицы (как кур, так и петухов). Вывод здоровых цыплят составил в I опытной группе 75,74%, во II опытной – 74,63 и в III – 73,16%, что на 3,68; 2,57 и 1,10% выше контроля.

Качество спермы. Было установлено, что в возрасте 82-х недель самцы опытных групп превосходили контрольную по объему эякулята на 9,80, 5,88 и 3,92%, концентрации спермиев в эякуляте – на 16,06 ($P<0,01$), 7,23 и 5,22%, и общему числу спермиев в эякуляте – на 11,56 ($P<0,05$), 8,16 и 9,52% соответственно группам.

По сравнению с предыдущими данными количество морфологически аномальных клеток в эякуляте петухов подопытных групп увеличилось, особенно в контрольной группе на 0,78%. Однако в опытных группах, несмотря на некоторое увеличение данного показателя в сравнении с предыдущими, оно оказалось ниже по отношению к контролю на 33,91 ($P<0,01$), 28,55 ($P<0,01$) и 28,23% ($P<0,01$) соответственно группам (Таблица 12).

Таблица 12. Качество производства спермы у петухов в возрасте 82 недели (перед убоем).

Показатель	Группа			
	Контроль	I	II	III
цвет	белый	белый	белый	белый
Объем эякулята, мл	0.51±0.04	0.56±0.03	0.54±0.04	0.53±0.05
Общее количество сперматозоидов в эякуляте, млрд.	1.47±0.04	1.64±0.05	1.59±0.04	1.61±0.05
Концентрация сперматозоидов, млрд/мл	2.49±0.07	2.89±0.05	2.67±0.08	2.62±0.06
Количество морфологически аномальных половых клеток в эякуляте, %	15.40±0.62	11.50±0.58	11.98±0.73	12.01±0.67

8. Результаты анализа длины теломерных участков хромосом, стабильности ядерной и митохондриальной ДНК у групп кур, получающих стандартный корм и корм, обогащенный пробиотическими препаратами.

Исследование длины теломерных участков хромосом. Исследование длины теломерных участков хромосом. Проведено исследование длины теломерных участков хромосом в клетках крови у контрольной и трех опытных групп кур возрастом 570 дней. В каждой группе исследовали ДНК 30 особей.

Анализ относительной длины теломер проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени путем оценки соотношения числа ампликонов теломерных областей к ампликонам однокопийных участков (гены *gapdh*, *rplp0*). Основные параметры методики (праймеры, условия проведения реакции и т.д.) были разработаны нами на предыдущих этапах проекта. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Studio v. 1.0.136. В большинстве исследуемых групп полученные значения не соответствовали нормальному распределению, и для статистической оценки различий мы использовали U-критерий Манна — Уитни.

Результаты оценки относительной длины теломерных участков хромосом представлены на рисунке 3. Этот показатель составил: 2.4 ± 1 в контрольной группе, 2.6 ± 0.9 в I группе, 2.3 ± 1 во II группе, 2.4 ± 1 в III группе.

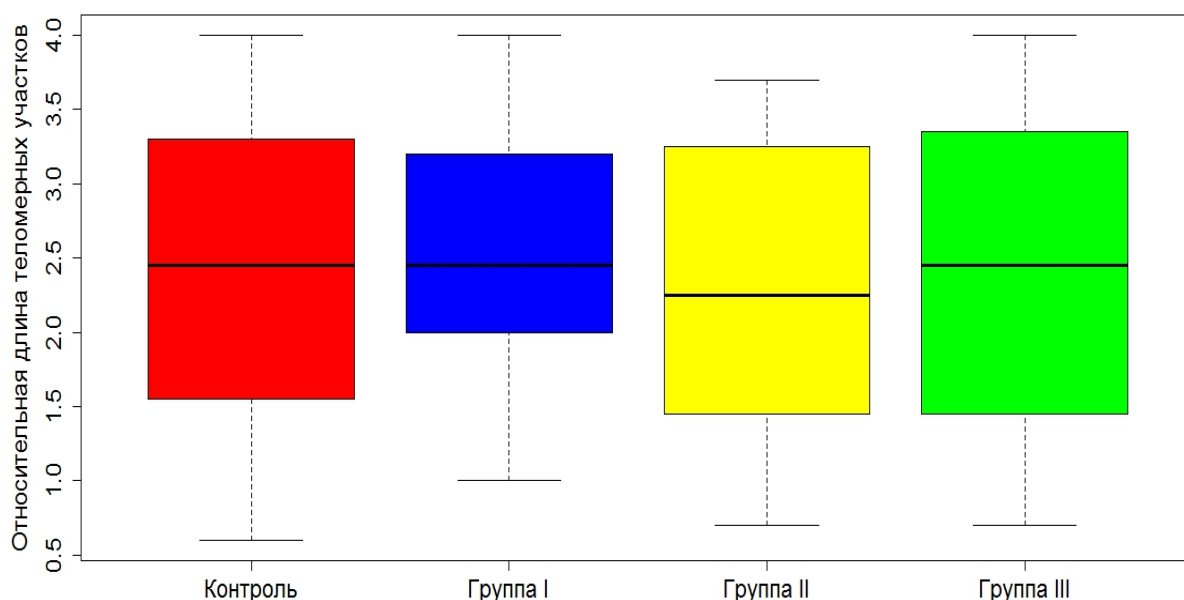


Рисунок 3. Относительная длина теломерных участков хромосом у контрольной и трех опытных групп кур.

Результаты Статистически значимых различий в относительной длине теломер между контрольной и экспериментальными группами не установлено. Интересно отметить, что у 570 дневных кур длина теломерных участков хромосом в 14-16 раз меньше ($P < 0.001$) по сравнению с суточными цыплятами.

Полученные нами данные о возрастных изменениях длины теломерных участков у кур соответствуют результатам других исследований (Kim et al., 2011, Sohn et al., 2014).

Исследование стабильности ядерной и митохондриальной ДНК. Исследование стабильности ядерной и митохондриальной ДНК. Количественный анализ повреждений митохондриальной (мтДНК) и ядерной (ядДНК) ДНК исследовали в образцах, которые мы использовали для оценки относительной длины теломерных участков хромосом, путем измерения концентрации длинных (более 10 т.п.н.) ПЦР

продуктов (по конечной точке) с последующей поправкой на уровень копийности митохондриальной или ядерной ДНК. Основные параметры методики (праймеры, условия проведения реакции и т.д.) были разработаны нами на предыдущих этапах проекта. Группой сравнения служили образцы ДНК, выделенные из клеток крови суточных цыплят. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Studio v. 1.0.136. В большинстве исследуемых групп полученные значения не соответствовали нормальному распределению. И для статистической оценки различий использовали U-критерий Манна — Уитни.

Полученные результаты относительного числа повреждений в мтДНК кур представлены на рисунке 4. Этот показатель составил: 2.26 ± 0.56 в контрольной группе, 1.69 ± 0.45 в I группе, 2.17 ± 0.46 во II группе, 2.23 ± 0.6 в III группе. По сравнению с контрольной группой было выявлено статистически значимое изменение показателя только в I группе, а именно снижение числа повреждений на 34 % ($P=0.009$).

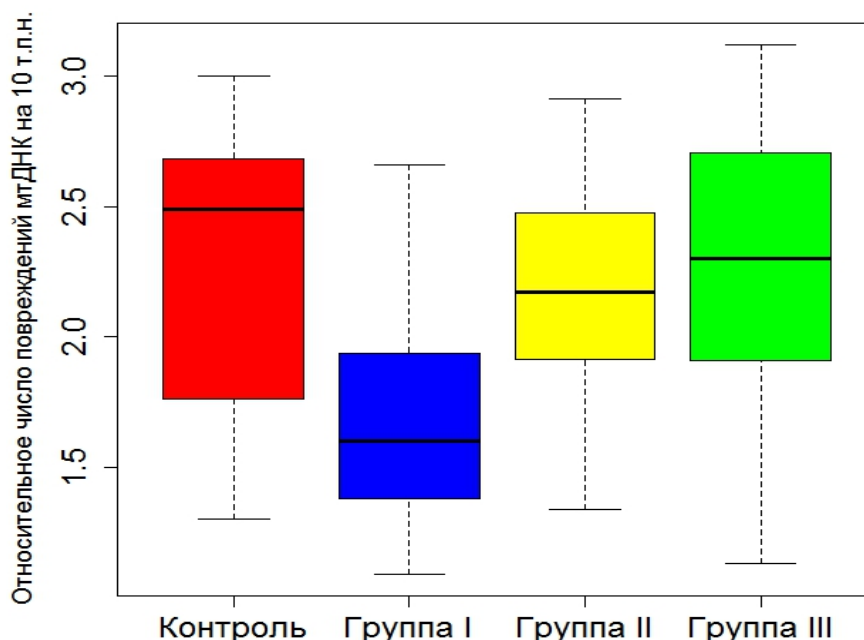


Рисунок 4. Относительное число повреждений в митохондриальной ДНК у контрольной и трех опытных групп кур.

В связи с тем, что исследования действия пробиотиков на стабильность митохондриальной ДНК у млекопитающих и, особенно, у птиц приведены в литературе только в единичных публикациях (Wollowski et al., 2001, Park et al., 2007), полученные нами результаты представляют особый интерес.

Полученные результаты относительного числа повреждений в яДНК кур представлены на рисунке 5. Этот показатель составил: 2.36 ± 0.67 в контрольной группе, 2.18 ± 0.56 в I группе, 2.34 ± 0.54 во II группе, 2.31 ± 0.64 в III группе.

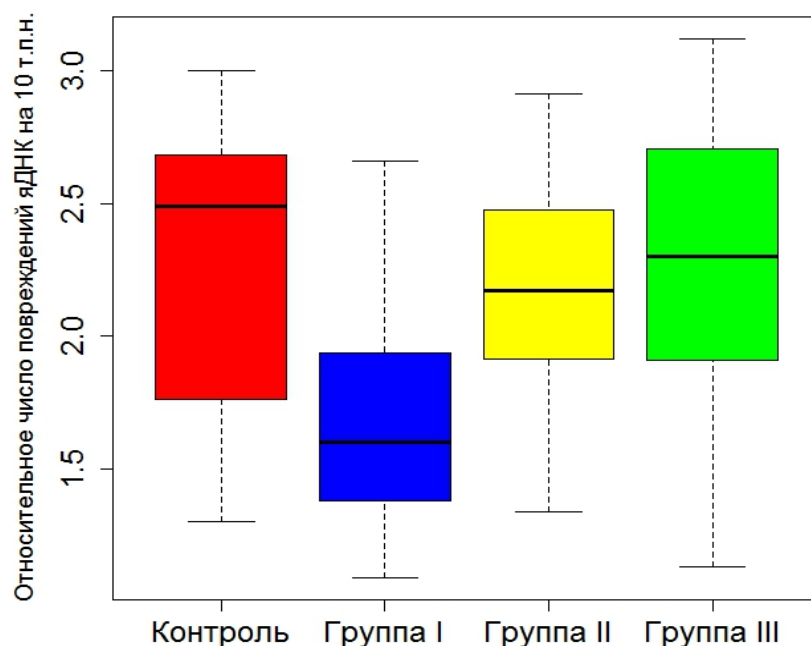


Рисунок 5. Относительное число повреждений в ядерной ДНК у контрольной и трех опытных групп кур.

В отличие от мтДНК, статистически значимых различий стабильности яДНК между контрольной и экспериментальными группами кур не установлено.

9. Разработка методики количественной оценки экспрессии генов синтеза вителлогенина у кур. Анализ уровня транскрипционной активности генов вителлогенина у контрольной и опытных групп птиц.

Известно, что вителлогенин является белком-предшественником яичного желтка, и гены, контролирующие его синтез активно экспрессируются в печени кур во время их репродуктивного периода (Evans et al., 1988). У птиц выявлено три гена синтеза вителлогенина: *vtg1*, *vtg2*, *vtg3* (Hughes, 2015). Для разработки методики использовали выделенную из тканей печени РНК 10 кур и 6 петухов возрастом 570 дней.

Для анализа транскрипционной активности генов выделенную РНК, сначала обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США), затем проводили реакции обратной транскрипции с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). В качестве отрицательного контроля обратной транскрипции для каждого образца использовали ту же реакционную смесь, однако, с добавлением воды вместо фермента (MMLV). Смесь инкубировали 60 минут при 39 °С и затем останавливали реакцию прогреванием смеси при 75°С в течение 10 минут. Полученную в ходе реакции обратной транскрипции кДНК использовали для дальнейшего ПЦР анализа. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием разработанных нами праймеров (табл. 1) и набора реактивов с интеркалирующим красителем EVA Green (Синтол, Россия) на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) по следующей программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 мин., затем 35 циклов, включающих денатурацию при 95 °С – 15 сек., отжиг при 60°С – 25 сек. и элонгацию при 72 °С – 30 сек.

Праймеры были специфично подобраны к нуклеотидным последовательностям генов (таблица 13), взятых в банке данных NCBI.

Таблица 13. Праймеры, разработанные для анализа относительной экспрессии.

Ген	NCBI Gene ID	Последовательность прямого праймера (5'-3')	Последовательность обратного праймера (5'-3')	Размер ампликона (п.н.)
Гены синтеза вителлогенина				
<i>vtg1</i>	424547	ACATGCTACTCCGTTGACC C	TCTGCCATTCCAACAGGCT T	127
<i>vtg2</i>	424533	AAATGCCGTGAGCTTTGGT C	CTTGGGAATCAACACCCGC CA	124
<i>vtg3</i>	424534	GCAGTGAGTTTTGCTCAGT CC	CAGCCTTCTGCACAGCGT AA	161
Референсные гены				
<i>actb</i>	396526	TGCCTCTAGCTCTTCCCTGG AA	CCACAGGACTCCATACCC AA	129
<i>gapdh</i>	374193	TGAGCTGAATGGGAAGCTT ACTG	CATCATACTTGGCTGGTTT CTCCA	104
<i>taf2</i>	428389	GCCATGGCTCTTCTGAGAG AT	AGAGTTGGCTAGGGCATC AA	150
<i>taf4</i>	419223	CCAACTTGACTGCATTAGC TGC	TCGCGTAAACTGTCTGGTT GT	146

Рекомендовано проводить нормализация результатов ОТ-ПЦР с использованием нескольких референсных генов (Bustin et al., 2009). Мы включили в анализ 4 референсных гена: *actb*, *gapdh*, *taf2*, *taf4*. Анализ относительного уровня экспрессии проводили, используя стандартный метод ΔC_t , согласно формуле: $R = 2 \times E^{-\Delta C_t}$, где ΔC_t это разница между геном интереса и референсным геном, а E , эффективность ПЦР. Нормализацию уровня экспрессии всех генов интереса (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*) проводили по среднему геометрическому значению всех референсных генов. Эффективность ПЦР определяли путем построения калибровочной кривой. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Studio v. 1.0.136. В большинстве исследуемых групп полученные значения не соответствовали нормальному распределению. И для статистической оценки различий использовали U-критерий Манна — Уитни

В результате анализа относительного уровня экспрессии были получены следующие значения: у кур *vtg1* – 50.2 ± 14.2 , *vtg2* – 72.5 ± 13.7 , *vtg3* – 0.01 ± 0.003 и петухов *vtg1* – 0.07 ± 0.06 , *vtg2* – 0.12 ± 0.09 , *vtg3* – 0.0009 ± 0.0008 . Уровень транскрипционной активности генов *vtg1*, *vtg2*, *vtg3* у петухов был более чем в 100 раз ($P < 0.01$) ниже чем у кур. Дополнительно мы исследовали уровень мРНК генов *vtg1*, *vtg2*, *vtg3* еще у четырех 570 дневных кур с уже редуцированными яйцеводами. Уровень экспрессии генов *vtg1*, *vtg2*, *vtg3* у этих кур достоверно не отличался от соответствующих показателей петухов. Интересно отметить, что наибольший уровень транскрипционной активности обнаружен у гена *vtg2*, чуть меньше у *vtg1* и значительно меньше у *vtg3*, что согласуется с данными

литературы (Evans et al., 1988). Таким образом, полученные данные экспериментально подтвердили информативность методики, которую можно использовать для оценки репродуктивного состояния у кур.

С помощью данной методики был проведен анализ транскрипционной активности генов *vtg1*, *vtg2*, *vtg3* у контрольной и трех опытных групп кур возрастом 570 дней. В каждой группе исследовали РНК у 12 особей.

Результат анализа уровень экспрессии гена *vtg1* у кур представлен на рисунке 6. Этот показатель составил: 52.9 ± 10.1 в контрольной группе, 69.8 ± 17.8 в I группе, 58.5 ± 14.6 во II группе, 63.5 ± 12.8 в III группе. Достоверное повышение уровня мРНК *vtg1* отмечено для I группы на 31 % ($P=0.005$) и III группы на 20 % ($P=0.038$).

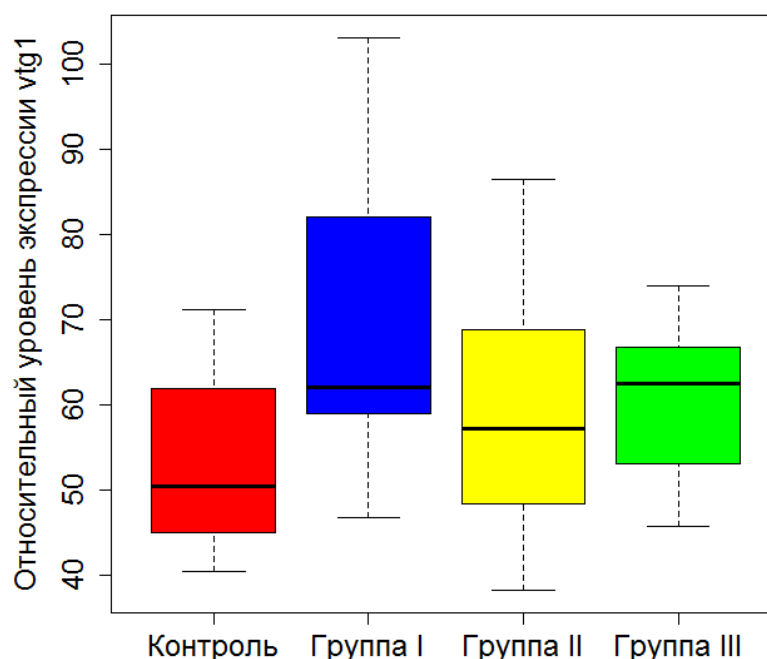


Рисунок 6. Относительный уровень экспрессии гена *vtg1* у контрольной и трех опытных групп кур.

Результат анализа уровень экспрессии гена *vtg2* у кур представлен на рисунке 7. Этот показатель составил: 73.5 ± 8.5 в контрольной группе, 99.5 ± 29.4 в I группе, 85.5 ± 15.3 во II группе, 82.5 ± 13.5 в III группе. Достоверное увеличение транскрипционной активности гена *vtg2* было выявлено только у кур I группы на 35 % ($P=0.003$).

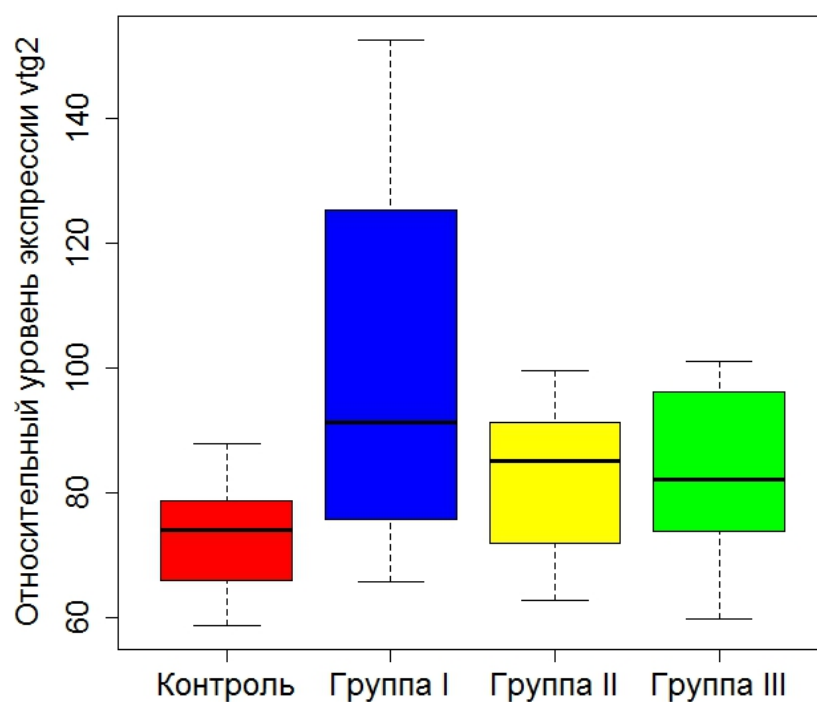


Рисунок 7. Относительный уровень экспрессии гена *vtg2* у контрольной и трех опытных групп кур.

Результат анализа уровень экспрессии гена *vtg3* у кур представлен на рисунке 8. Этот показатель составил: 0.011 ± 0.002 в контрольной группе, 0.020 ± 0.006 в I группе, 0.015 ± 0.007 во II группе, 0.017 ± 0.007 в III группе. По сравнению с контролем уровень мРНК *vtg3* был достоверно выше у кур I группы на 82 % ($P=0.0003$) и у кур III группы на 58 % ($P=0.0029$).

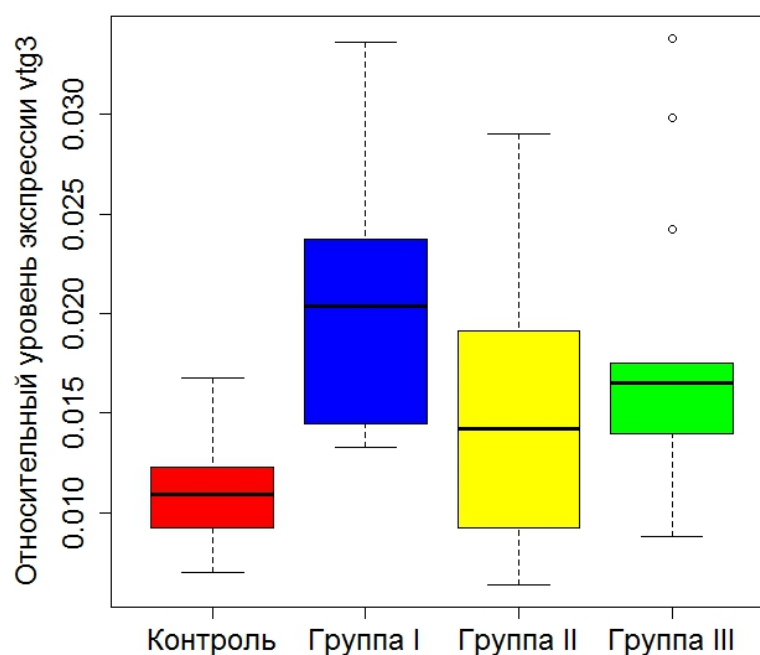


Рисунок 8. Относительный уровень экспрессии гена *vtg3* у контрольной и трех опытных групп кур.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что пробиотическая добавка *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 (I группа) снижала уровень повреждений митохондриальной ДНК и повышала транскрипционную активность генов синтеза вителлогенина (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*), а комбинированный пробиотический препарат (III группа) вызвал лишь увеличение экспрессии генов *vtg1* и *vtg3*. Важно отметить, что активность генов синтеза вителлогенина может быть информативным показателем репродуктивного старения у кур.

10. Результаты текущего контроля качества корма.

Контроль качества корма, тесты на токсичность, генотоксичность и мутагенность проводились по разработанной нами методике, подробно описанной в предыдущих отчетах и нашей статье (Chistyakov et al., 2017). Стандартные параметры токсичности корма не превышали нормативные показатели по ГОСТ 18221-99. Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий В-1895 и KATMIRA 1933, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов. При действии образца добавки наблюдалось подавление жизнедеятельности биосенсорного штамма *E. coli* MG1655 *pXen7-lux* на $7,9 \pm 0,3\%$; подобный эффект можно считать незначительным по сравнению с действием контрольного вещества ($ZnSO_4$) и отличающимся от значения, полученного в 2017г (8,2%), в пределах статистической погрешности. Для остальных штаммов при действии обоих образцов эффект был нулевым.

При действии спиртового экстракта корма не наблюдалось статистически достоверного усиления уровня мутагенеза как в условиях метаболической активации, так и без нее, тогда как положительный контроль демонстрировал обычное для данного теста усиление уровня мутагенеза. Таким образом, можно заключить, что изученные образцы корма не содержали потенциальных генотоксинов и мутагенов.

11. Построение математической модели репродуктивного старения

На основании полученных данных была построена регрессионная математическая модель, позволяющая оценить степень замедления репродуктивного старения птиц. Основой для модели послужили данные по яйценоскости кур.

Было проведено сравнение яйценоскости контрольной и опытных групп с помощью непараметрического теста Вилкоксона. Полученные значения уровня значимости превышения опытных значений над контрольными приведены в таблице 14.

Таблица 14. Значимость превышения опытных значений яйценоскости над контрольными.

Опытная группа	Уровень значимости
I	$2.486 \cdot 10^{-12}$
II	$5.874 \cdot 10^{-11}$
III	$2.323 \cdot 10^{-6}$

Как видно, яйценоскость опытных групп с высокой достоверностью выше яйценоскости контрольной группы.

Динамика яйценоскости контрольной и опытных групп приведена на диаграмме ниже (рисунок 9).

На диаграмме видно, что с 35 недели яйценоскость как контрольной, так и опытных групп имеет тенденцию к снижению. Для расчета и сравнения скорости падения относительной яйценоскости была взята методика расчета относительной плодовитости (Yakovleva, 2016), при этом относительная яйценоскость представляет собой нормализованную разницу яйценоскости опытной и контрольной групп (рассматривались данные с 35 по 82 неделю).

Относительная яйценоскость рассчитывалась по формуле

$$ОЯ = (Яй_о - Яй_к) / Яй_к \quad (1)$$

где:

Яй_о — яйценоскость опыта

Яй_к — яйценоскость контроля

ОЯ — относительная яйценоскость

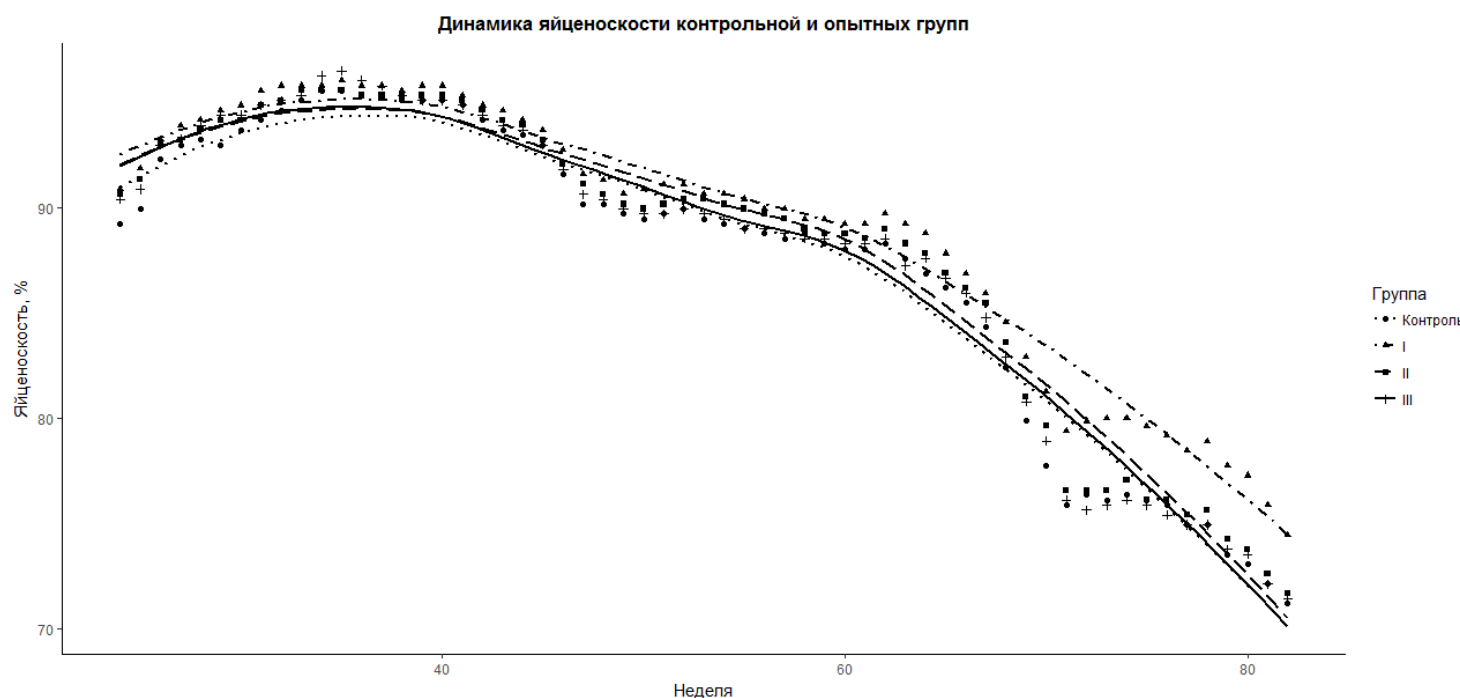
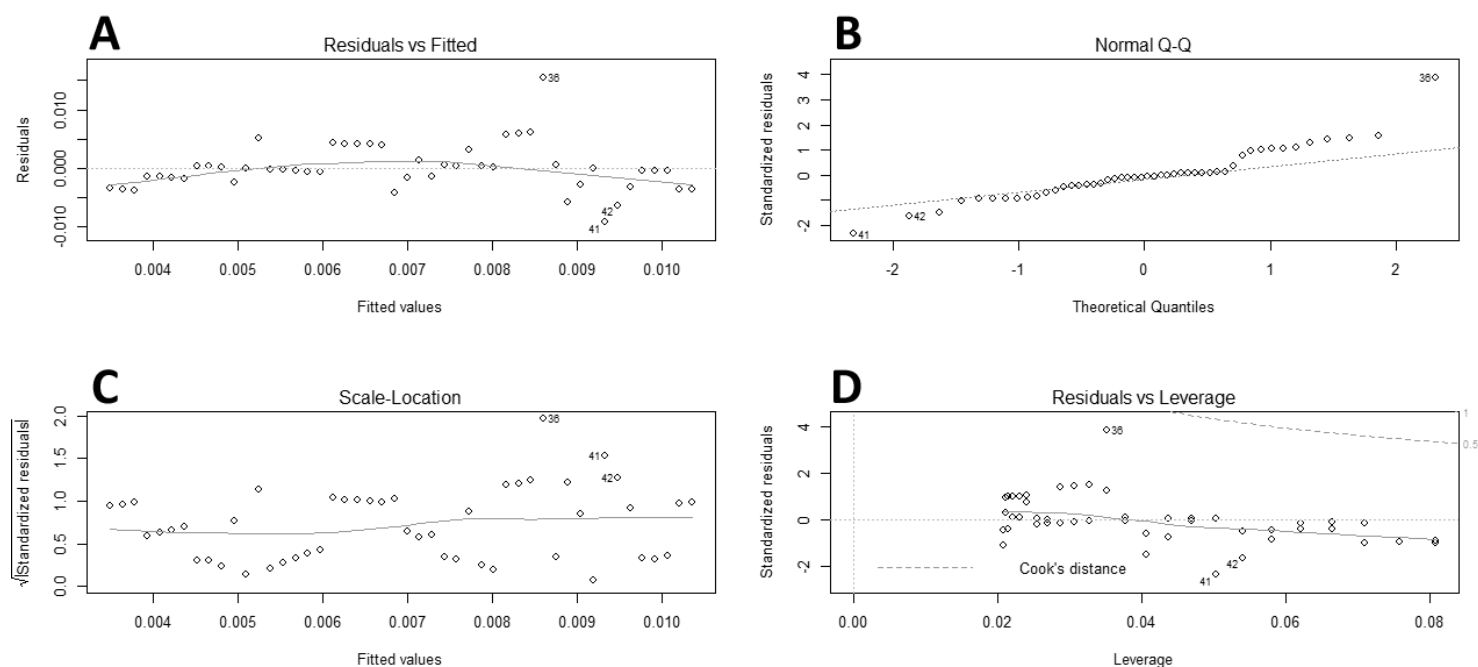


Рис. 9 Динамика яйценоскости контрольной и опытной групп.

Штатными методами среды разработки R (версия 3.4.3 пакет stats, функции `lm()`, `plot()`) была исследована возможность построения регрессионной модели по полученным данным. В качестве предиктора используется неделя наблюдения. Ниже приведена диаграмма для значения относительной яйценоскости II группы (рисунок 10), остальные наборы данных дают аналогичные результаты.



На диаграмме анализируются характеристики:

Линейность - верхняя левая диаграмма. Если зависимая переменная линейно связана с независимой, то связь между остатками и предсказанными значениями отсутствует, точки располагаются в форме полосы.

Нормальность - верхняя правая диаграмма. Если допущение о нормальном распределении выполняется, то точки на этой диаграмме должны ложиться на прямую.

Гомоскедастичность (наличие одинаковой дисперсии для разных величин) - нижняя левая диаграмма. Точки должны располагаться в форме полосы вокруг горизонтальной линии.

Напряжение - нижняя правая диаграмма. Влиятельные наблюдения, вносящие наибольший вклад отмечены на графике.

Видно, что напряжение создает точка за номером 36, которая соответствует 70-й неделе наблюдений.

Диаграмма влияния для этого же набора данных, полученная с помощью функции библиотеки `car`, подтверждает полученные результаты (рис.11):

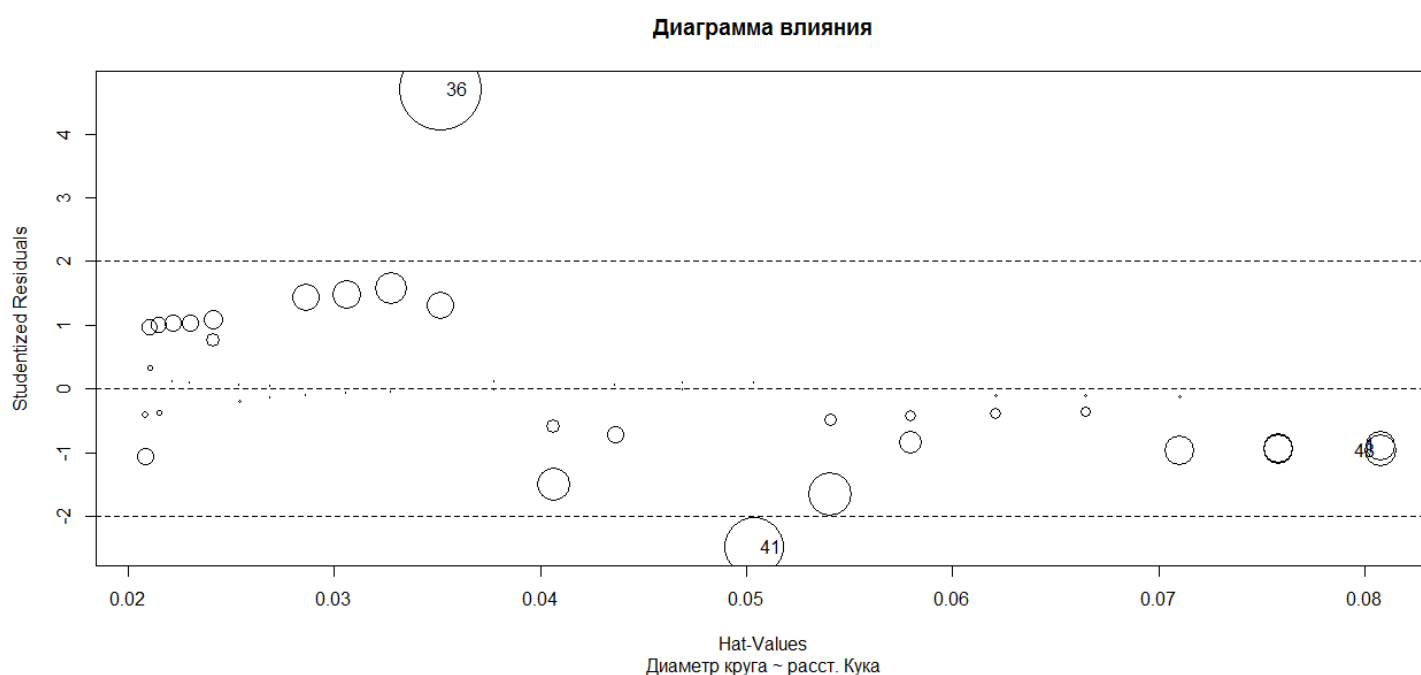


Рисунок 11. Диаграмма влияния

Далее были построены линейные регрессионные модели. Поскольку интерес представляет тенденция изменения относительной яйценоскости, ниже приведены значения линейного коэффициента регрессии, представляющие собой тангенс угла наклона прямой изменения относительной яйценоскости.

Таблица 15. Значения линейного коэффициента регрессии для параметра относительной яйценоскости.

Опытная группа	Доверительный интервал коэффициента регрессии (95%)		p-value (уровень значимости)	R-squared (множественный коэффициент детерминации)
	От	До		
I	0.0009482634	0.001268487	$2.2 \cdot 10^{-16}$	0.8085
II	$6.067836 \cdot 10^{-5}$	0.0002317593	0.00124	0.2048

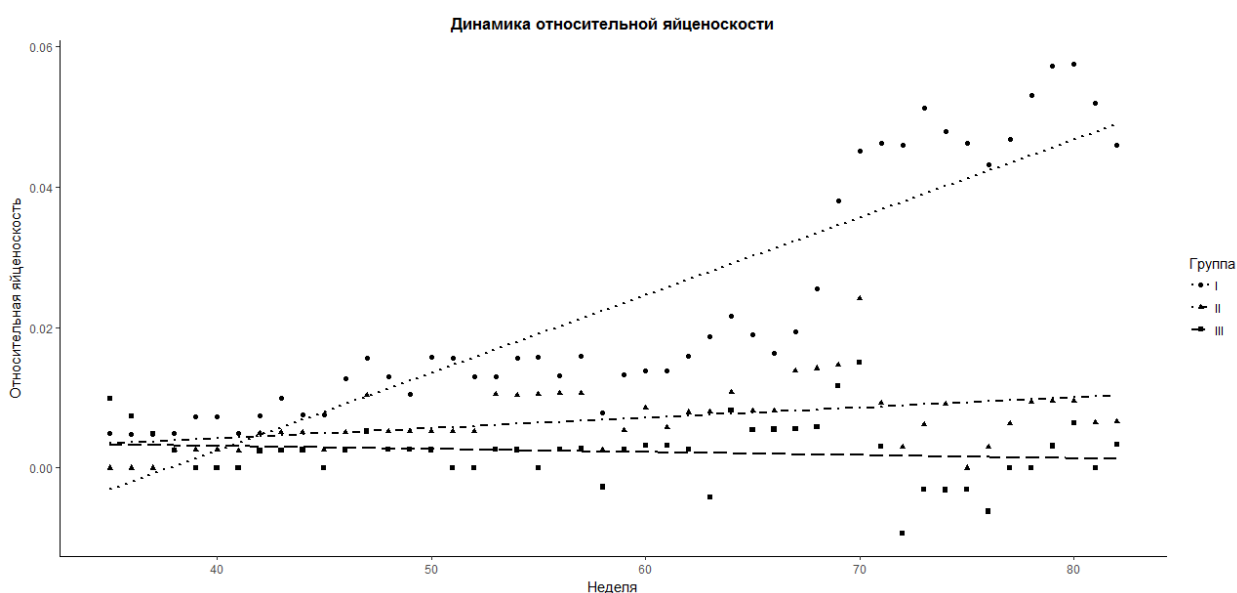
III	-0.0001334816	$4.606124 \cdot 10^{-5}$	0.3322	0.02045
-----	---------------	--------------------------	--------	---------

Линейные регрессионные модели I и II опытных групп статистически достоверны и дают интерпретируемые результаты. Для III группы предложенный метод достоверных результатов не дал.

На диаграмме (рисунок 13) приведена динамика изменения относительной яйценоскости с 35 по 82 неделю.

Нетрудно усмотреть, что относительная яйценоскость в статистически достоверных случаях (для I и II опытных групп) растет со временем. Если трактовать яйценоскость как характеристику степени старения у кур, на основании полученных данных можно сделать вывод о замедлении темпа старения в этих группах.

В III опытной группе статистически достоверных данных нет и можно говорить о необходимости проведения дополнительных исследований.



Таким образом, из модели следует, что относительная (по сравнению с контролем) яйценоскость в статистически достоверных случаях (для I и II опытных групп) растет со временем. Если трактовать яйценоскость как характеристику степени старения у кур, на основании полученных данных можно сделать вывод о замедлении темпа старения в этих группах. Так, на 82 неделе яйценоскость в I группе превышала контроль на 4%. Проведенный нами регрессионный анализ динамики изменения относительной яйценоскости позволяет заключить, что темп старения кур в I опытной группе по сравнению с контрольной замедлился на 2.1%

Заключение.

Эксперимент продлился 82 недели, длительность была обусловлена требованиями к производственной технологии. Все задачи, поставленные в рамках эксперимента, были выполнены, все цели – достигнуты.

Было продолжено лабораторное производство препаратов, необходимых для исследования эффектов пробиотических бактерий, по разработанной нами методике. Выход сухого препарата за одну выработку составил 750+50 г, содержание

жизнеспособных клеток использованных штаммов составило $4-8 \cdot 10^9$ КОЕ в одном грамме сухого препарата.

Был проведён ряд экспериментов для оптимизации параметров твердофазной ферментации спорообразующих бацилл. Было установлено, что субстратом для получения препарата могут служить такие дешёвые субстраты, как соя и горох. Также субстратом может служить подсолнечный жмых, но в таком случае выход бактерий меньше. Подобраны оптимальные параметры инокуляции, температуры инкубации и сушки препарата. Показано, что исследуемые бактерии способны к разложению крахмала и белка, что позволяет им хорошо расти на предложенных субстратах

Было установлено, что ДНК-протекторная активность штаммов сохраняется в фракции метаболитов <3 кДа для *B.amyloliquifaciens* B-1895 и <10 кДа для *B.subtilis* KATMIRA 1933. С помощью хроматомасс-спектрометрии методом разделения по молекулярным ионам было установлено, что целевые метаболиты имеют m/z 876, 836, 577 и 390. Эти и другие ранее установленные свойства данных веществ позволяют предположить, что это короткие стабильные молекулы олигопептидов.

Было показано, что обычные и армированные штаммы способны к биоплёнкообразованию. Получены электронные микрофотографии биоплёнок в готовом препарате, показано, что бактерии в препарате плотно упакованы в матриксе.

В ходе изучения динамики характеристик и параметров микрофлоры ЖКТ, было установлено, что микрофлора птиц не изменялась в течение всего периода наблюдений. Бактерии р. *Bacillus* при стандартной дозировке полностью усваивались птицей и из экскрементов не выделялись.

Была получена коллекция пробиотических штаммов бактерий, выделенных из кишечника птиц. Список штаммов в коллекции: *Lactobacillus salivarius* 01, *Lactobacillus salivarius* 02, *Lactobacillus salivarius* 03, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus crispatus* 01, *Lactobacillus crispatus* 02, *Lactobacillus crispatus*, 03, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Enterococcus durans*, *Bifidobacterium ovatus* 01, *Bifidobacterium ovatus* 02, *Bifidobacterium bifidum*.

Мониторинг физиологических параметров опытных и контрольной групп птиц показал, что обнаруженная тенденция превышения набора живой массы во всех опытных группах над контрольной сохранялась на всём протяжении жизни птиц вплоть до 81-й недели. Различия в параметрах репродуктивных органов так же сохранялись на протяжении всего периода. Тенденции к улучшению биохимических показателей крови сохранялись, было обнаружено повышение уровня глюкозы, не превышающее нормативов. Вплоть до 81-й недели объём спермы петухов превышал контроль. Для всех групп наблюдалось естественное снижение яйценоскости, связанное с возрастом, однако в опытных группах I и II оно происходило медленнее. В яйцах кур-несушек опытных групп наблюдалось увеличение количества кальция и фосфора.

Тестирование токсичности и генотоксичности образцов корма (экстракта корма и кормовой добавки) показало, что образцы корма и использованной для его обогащения кормовой добавки, содержащей препараты на основе пробиотических бактерий, не демонстрируют токсических, генотоксических и прооксидантных эффектов и не содержат потенциальных генотоксинов и мутагенов

8. Статистически значимых различий в относительной длине теломер между контрольной и экспериментальными группами не установлено.

По сравнению с контрольной группой в I группе было выявлено статистически значимое снижение числа повреждений митохондриальной ДНК, тогда как статистически значимых различий стабильности яДНК не установлено. Установлено, что пробиотическая добавка *Bacillus subtilis* КАТМІРА1933 (I группа) повышала транскрипционную активность генов синтеза вителлогенина (vtg1, vtg2, vtg3), которые могут быть использованы для оценки репродуктивного состояния кур, а комбинированный пробиотический препарат (III группа) вызвал увеличение экспрессии генов vtg1 и vtg3.

Таким образом мы добились увеличения продуктивности птиц в репродуктивный период за счет замедления старения. Молекулярной основой наблюдаемого эффекта является стабилизация митохондриальной ДНК, физиологической основой по-видимому является стимуляция выработки вителлогенина.

Была построена модель репродуктивного старения кур на основе данных по яйценоскости. Проведенный нами регрессионный анализ динамики изменения относительной яйценоскости позволяет заключить, что темп старения кур в I опытной группе по сравнению с контрольной замедлился на 2.1%

Таким образом, эксперимент показал, что хроническое введение препарата, содержащего пробиотические бациллы, выделяющие комплекс природных антиоксидантов и ДНК-протекторов (Prazdnova et al., 2015), не только стимулирует рост и яйценоскость продуктивной птицы, но и замедляет возрастное падение яйценоскости, а, следовательно, замедляет репродуктивное старение. Молекулярной основой такого замедления является стабилизация митохондриальной ДНК, но не замедление укорочения теломер. Результаты, полученные в ходе проекта, открывают путь к созданию семейства пробиотических препаратов нового поколения, действие которых направлено на получение целого спектра полезных для птицеводства эффектов через стабилизацию митохондриального генома. Облегчает движение в этом направлении то, что в ходе проекта нами была апробирована твердофазная ферментация пробиотических бацилл, которая может стать основой производства с недостижимыми до сих пор параметрами экономической эффективности.

Список использованных источников.

1. Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных. Методические указания (рег. №13-5-02/1043 от 11.05.2004)
2. Марданова А.М., Кабанов Д.А, Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие / Казань: К(П)ФУ, 2016, - 42 с.
3. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem 55(4): 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
4. Chistyakov V.A., Usatov A.V., Klimenko A.I., Kolosova M.A., Prazdnova E.V., Tutel'ian A.V. Determination of the Mutagenicity of 2-aminoanthracene Using Chicken Hepatic S-9 Fraction // OnLine Journal of Biological Sciences, 2018

5. Evans M.I., Silva R, Burch J.B. (1988) Isolation of chicken vitellogenin I and III cDNAs and the developmental regulation of five estrogen-responsive genes in the embryonic liver. *Genes & Dev* 2: 116-124 <https://doi.org/10.1101/gad.2.1.116>
6. He R. et al. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation // *Food Research International*. – 2012. – T. 49. – №. 1. – C. 432-438.
7. Hughes A.L. (2015) Life-history evolution at the molecular level: adaptive amino acid composition of avian vitellogenins. *Proc Biol Sci* 282(1812): 20151105. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1105>
8. Kim Y.J., Subramani V.K., Sohn S.H. Age Prediction in the Chickens Using Telomere Quantity by Quantitative Fluorescence In situ Hybridization Technique // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2011. – V. 24. - p. 603-609.
9. Park E., Jeon G.I., Park J.S., Paik H.D. A Probiotic Strain of *Bacillus polyfermenticus* Reduces DMH Induced Precancerous Lesions in F344 Male Rat // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2007. – Vol. 30. – p. 569-574.
10. 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
11. Sohn, S.H., Subramani V.K. Dynamics of Telomere Length in the Chicken // *World's Poultry Science Journal*. 2014. – V. 70. p. 721-735.
12. Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – V.73. p. 451-455
13. Yakovleva E. U., Naimark E. B., Markov A. V. Adaptation of *Drosophila melanogaster* to unfavorable growth medium affects lifespan and age-related fecundity // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – T. 81. – №. 12. – C. 1445-1460.
14. Yang B. W. et al. RNA-Seq Analysis of Antibiotic-Producing *Bacillus subtilis* SC-8 Reveals a Role for Small Peptides in Controlling PapR Signaling // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – C. 1-11.