

УДК 579.62

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ *Bacillus subtilis* GM2 И GM5 НА РОСТ И УСВОЯЕМОСТЬ КОРМОВ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Г.Ф. Хадиева¹, М.Т. Лутфуллин¹, А.А. Николаева¹, Н.К. Мочалова¹,
С.Ю. Смоленцев², А.М. Марданова¹, М.Р. Шарипова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола, 424000, Россия

Аннотация

В работе представлены данные по исследованию пробиотических свойств штаммов *Bacillus subtilis* GM2 и GM5. В опытах использовали 90 односуточных цыплят-бройлеров кросса Кобб 500, которые были случайным образом разделены на три группы: контрольную группу с основной диетой и две опытные группы (по 30 цыплят в каждой из групп), в рацион которых добавляли споры *B. subtilis* GM2 (группа 1) и GM5 (группа 2). Показано, что добавление спор штаммов GM2 и GM5 в концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/г в рацион цыплят-бройлеров улучшает показатели роста, повышает усвояемость питательных веществ кормов и модулирует кишечную микрофлору. Использование пробиотиков стимулировало увеличение живой массы цыплят на 6.30% и 13.78% ($p = 0.05$) относительно контроля. Среднесуточный привес у цыплят опытных групп 1 и 2 составил в среднем 52.82 ± 0.36 г и 56.54 ± 0.47 г на одного цыпленка, что выше показателей контрольной группы (49.69 ± 0.40 г) на 6.30% и 13.79% ($p = 0.05$) соответственно. Внесение в корма пробиотиков увеличивало количество молочнокислых бактерий в содержимом как тонкого кишечника, так и слепого кишечника (в меньшей степени) – из содержимого кишечника цыплят выделены и идентифицированы бактерии, относящиеся к семействам Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae и Clostridiaceae. Ветеринарно-санитарная экспертиза установила, что мясо цыплят опытных групп соответствует всем требованиям по органолептическим, физико-химическим и бактериоскопическим характеристикам ГОСТ. Таким образом, пробиотики на основе новых штаммов *B. subtilis* GM2 и GM5 положительно влияют на рост цыплят-бройлеров и усвояемость кормов.

Ключевые слова: пробиотики, *Bacillus subtilis* GM2, *Bacillus subtilis* GM5, цыплята-бройлеры, продуктивность, микробиота кишечника

Введение

Активный рост общей численности населения (согласно отчету Организации Объединенных Наций [1], уже к 2050 г. в мире будет проживать до 9 млрд человек) обуславливает непрерывно увеличивающийся спрос на продукты питания как растительного, так и животного происхождения. В связи с этим актуален поиск новых путей интенсификации продовольственного производства при одновременном снижении издержек и поддержании высоких стандартов качества и безопасности (для людей и окружающей среды) [2].

В области животноводства выходом из сложившейся ситуации стало использование кормовых добавок, которые положительно влияют на здоровье животных и одновременно позволяют увеличить объемы и качество производимых мяса, яиц, молока и рыбы. Соблюдение всех требований при производстве продуктов животноводства имеет важное значение и для поддержания здоровья человека как их потребителя – например, возбудители болезней кишечника животных (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria* и *Yersinia*) являются прямым источником загрязнения пищевых продуктов и причиной зоонозов, поэтому в настоящий момент внедряются новые методы животноводства, направленные на повышение качества и безопасности мяса [3].

Корма и кормовые добавки для животных должны соответствовать строгим критериям без повышения стоимости их разведения. Долгое время в животноводстве широко использовались антибиотики и другие лекарственные средства, следствием чего стало развитие и распространение резистентных микроорганизмов, создающих угрозу здоровью потребителей и оказывающих негативное воздействие на окружающую среду [4]. Однако с 1 января 2006 г. в Европейском союзе запрещено использование стимуляторов роста на основе антибиотиков. По этой причине ведется поиск альтернативных природных веществ, обеспечивающих похожие эффекты: в Постановлении (ЕС) № 767/2009 Европейского парламента о кормовых добавках, используемых для животных, среди других подобных веществ упоминаются пробиотики и пребиотики.

Согласно определению, сформулированному в 2002 г. экспертами ФАО и ВОЗ, «пробиотики» являются «живыми штаммами микроорганизмов, которые при их применении в достаточных количествах приносят пользу здоровью хозяина» [5]. Эффективность пробиотических препаратов зависит от многих факторов, поэтому при их применении важны выбор бактериальных штаммов и оптимальная дозировка. В настоящее время пробиотики широко используются в кормах для животных, особенно свиней и птицы [5]. Они могут содержать один или несколько штаммов микроорганизмов, в зависимости от вида и возраста животных-хозяев, и применяться в виде порошка, суспензии, капсул, гранул, геля или пасты (периодически или постоянно, непосредственно перорально или в качестве добавки к корму и премиксам [6]).

Первое поколение пробиотиков было создано на основе бифидобактерий (род *Bifidobacterium*) и лактобацилл (род *Lactobacillus*), которые являются представителями облигатной кишечной микрофлоры человека и теплокровных животных и преобладают в ней по численности и физиологической значимости [7]. Лактобациллы действуют путем конкурентного исключения патогенных бактерий, защищая от них кишечный эпителий [8], а также способствуют улучшению усвояемости кормов [9]. Бифидобактерии улучшают состояние кишечника за счет иммуностимуляции и производства летучих жирных кислот, полезных для организма хозяина [10, 11]. Несмотря на многообещающие перспективы использования лакто- и бифидобактерий, существует много проблем, связанных с масштабом их промышленного производства: они являются микроаэрофилами или строгими анаэробами, что затрудняет их массовое производство и обработку в сельскохозяйственных условиях; эти микроорганизмы медленно растут и чувствительны к высоким температурам, которые могут возникать при фрезеровании

и гранулировании кормов [12, 13]. В работе С. Сантини [14] только 2 из 11 различных видов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* выживали в моделируемой желудочной среде с pH 2.5 в течение 1 ч. В связи с этим явное преимущество перед использованием *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в качестве пробиотиков имеет применение для этих же целей *Bacillus* spp. (следующее поколение пробиотических препаратов). Бактерии рода *Bacillus* – факультативные анаэробы, способные в споровой форме выдерживать температуры до 113°C в течение 8 мин, что упрощает манипулирование и увеличивает вероятность сохранения бактерий на этапах обработки кормов [15, 16]. Кроме того, споры этих бактерий устойчивы к низким значениям pH, действию желчных солей и другим экстремальным условиям, встречающимся в желудочной среде птиц [17–19]. Они способствуют улучшению состояния кишечника не только путем конкурентного исключения патогенной микрофлоры, но и через выделение антимикробных пептидов (АМП), цитотоксичных для бактериальных патогенов, что способствует снижению риска возникновения кишечных инфекционных заболеваний, например, птичьего кокцидиоза [20–23]. *Bacillus* стимулирует иммунную систему кишечника путем увеличения уровней цитокинов и хемокинов, таких как интерлейкин-1 β (IL-1 β) и интерферон- γ (IFN γ) [24].

В настоящей работе представлены результаты исследования двух штаммов *Bacillus subtilis* с высокой антимикробной активностью [25] в качестве пробиотика для цыплят-бройлеров, целью которого было оценить влияние пробиотиков *B. subtilis* GM2 и GM5 на ростовые характеристики и микробиоту кишечника птицы, усвояемость питательных веществ кормов, а также качество мяса цыплят.

1. Материалы и методы

1.1. Штаммы бактерий, питательные среды и условия культивирования. Штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 с высокой антагонистической активностью были выделены из ризосферы картофеля [26]. Их пробиотические свойства *in vitro* были охарактеризованы нами ранее [25].

Бактерии культивировали на средах: 1) LA (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0, агар – 20.0; 2) капустный агар. Для получения капустного отвара 200 г измельченной свежей капусты заливали 1 л дистиллированной воды и кипятили в течение 30 мин. Отвар капусты фильтровали через ватно-марлевый фильтр, после чего на 1 л капустного отвара добавляли (г/л): пептон – 10.0, глюкозу – 20.0, CaCO₃ – 30.0, агар – 20.0.

Культивирование бактерий проводили при температуре 37 °С.

Споры бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 получали по методу, описанному в [25].

1.2. Эксперимент *in vivo*. Научно-практический опыт проводили в условиях крестьянско-фермерского хозяйства «Лачын» (Республика Марий Эл, Медведевский р-н, д. Среднее Азяково, 56°37'21" с. ш. 47°38'50" в. д.) на цыплятах кросса Кобб 500 суточного возраста в количестве 90 голов со средней живой массой 47.17 ± 3.13 г. Из отобранных цыплят была сформирована контрольная группа – 30 цыплят, получавших полнорационный комбикорм – и две опытные группы – по 30 голов, получавших комбикорм с добавлением суспензии спор

бактерий *B. subtilis* GM2 и *B. subtilis* GM5 в концентрации $1 \cdot 10^7$ КОЕ/г корма. С 0-е по 10-е сутки цыплята получали комбикорм «Стартер» (ООО «Алгоритм Инвестиций») в виде гранул, с 11-е по 20-е сутки – «Гроуэр» (ООО «Алгоритм Инвестиций») в виде крупки, а с 21-ого дня и до уоя (42-й день) – «Финишер» (ООО «Алгоритм Инвестиций») в виде гранул. Пробиотик вносили в сухой корм опрыскиванием пульверизатором при постоянном ручном перемешивании. Цыплят содержали в вентилируемых клеточных батареях при температуре 35–36 °С и постоянном искусственном освещении. В ходе эксперимента проводили ежедневное взвешивание цыплят опытных и контрольных групп, а также определяли их общий вес, среднесуточные приросты массы тела и сохранность поголовья. Количество потребляемого корма устанавливали путем измерения остатка корма на еженедельной основе с начала эксперимента. Количество потребленного корма пересчитывали на одного цыпленка. Коэффициент конверсии корма рассчитывали путем деления потребленного корма на прирост массы тела:

$$\text{Ип} = \frac{\text{ЖМ} \cdot \text{Сп} \cdot 100}{\text{Пв} \cdot \text{Зк}},$$

где Ип – европейский индекс продуктивности, ЖМ – средняя живая масса, кг; Сп – сохранность поголовья, %; Пв – продолжительность выращивания, сут; Зк – затраты корма на 1 кг прироста, кг.

1.3. Микробиологический анализ содержимого ЖКТ цыплят-бройлеров.

Образцы содержимого кишечника трех цыплят из каждой группы были отобраны в стерильные фальконы после уоя (на 42-е сутки). На 1 г содержимого тонкого и слепого кишечника добавляли физиологический раствор в объеме 9 мл, после чего из получившейся суспензии готовили ряд последовательных разведений, доводя разбавление исходного материала до $1:10^9$. Из суспензий с соответствующим разведением делали посев «газоном» по 0.1 мл на поверхность дифференциально-диагностической агаризованной среды ЭНДО для выявления бактерий группы кишечной палочки и ВСА для выделения сальмонелл и шигелл, а также посев по 1 мл глубинным методом на среды МПА для определения общего количества бактерий (ОМЧ), на капустный агар для выявления молочнокислых бактерий (лактобацилл и бифидобактерий).

1.4. Идентификация изолятов. Колонии бактерий, различные по морфологическим признакам, были отобраны, выделены в чистую культуру и идентифицированы на MALDI BioTyper (Bruker Daltonik). Исследование с помощью MALDI BioTyper осуществляли на основе сравнения полученного ряда их константных белков с базой данных. Видовую принадлежность определяли при значениях параметра Score 2.300–3.000.

1.5. Ветеринарно-санитарная оценка мяса цыплят-бройлеров. Для ветеринарно-санитарной оценки влияния пробиотиков на мясо цыплят-бройлеров был проведен комплекс органолептических и лабораторных исследований по 3 тушкам из каждой группы цыплят в возрасте 42 сут.

Органолептическое исследование проводили согласно ГОСТ 7702.0-74 «Мясо птицы. Методы отбора образцов. Органолептические методы оценки качества»

[27]. При этом определяли внешний вид, запах, цвет, консистенцию мышечной ткани и жира, степень обескровливания, состояние мышц на разрезе, прозрачность и ароматность бульона.

Бактериологическое исследование мышечной ткани проводили по ГОСТ 7702.2-74 «Мясо птицы. Методы бактериологического анализа».

Бактериоскопические исследования включали исследование мазков отпечатков с поверхности тушек, которые окрашивали по Граму [27].

Физико-химические исследования проводили согласно ГОСТ 7702.2-74 «Мясо птицы. Методы химического и микроскопического анализа свежести мяса» по следующим показателям: pH, содержание аминокислотного азота, активность пероксидазы, бензидиновая проба, реакция с сернистой медью и реакция на аммиак и соли аммония, кислотное и перекисное число жира [27].

Биологическую ценность и безвредность определяли с использованием тест-объектов – реснитчатых инфузорий *Tetrahymena pyriformis* – по [27].

Выявление минеральных элементов свинца и кадмия в мясе птицы проводили согласно ГОСТ 33824-2016 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрический метод определения содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка)» [28], ртути – ГОСТ 56931-2016 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Вольтамперометрический метод определения содержания ртути [29] и мышьяка – ГОСТ 31628-2012 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрический метод определения массовой концентрации мышьяка» [30].

Дегустацию вареного и жареного мяса оценивали по 5-балльной шкале согласно ГОСТ 9959-2015 «Мясо и мясные продукты. Общие условия проведения органолептической оценки (с Поправкой)» [31] по следующим показателям: внешний вид, цвет и вид на разрезе, запах (аромат), консистенция, вкус.

Математическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism, GraphPad Software (LA Jolla, США) с использованием двухстороннего дисперсионного анализа Two-way ANOVA и критерия Тьюки для множественного парного сравнения количественных показателей разных групп. Статистический анализ полученных результатов проводили, руководствуясь рекомендациями в [32].

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Изменение показателей прироста и потребления корма у цыплят при добавлении пробиотиков *B. subtilis* GM2 и GM5 в их рацион. Результаты исследования влияния пробиотиков на основе спор *B. subtilis* GM2 (опытная группа 1) и GM5 (опытная группа 2) на динамику роста цыплят-бройлеров кросса Кобб 500 приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что при кормлении комбикормом «Стартер» (табл. 2) в обеих опытных группах с 0-е по 10-е сутки происходит достоверное ($p = 0.05$) увеличение привесов (на 10.53% и 10.83% соответственно), потребления корма (11.89% и 10.99% соответственно) по сравнению с цыплятами контрольной группы. С 11-е по 20-е сутки при кормлении комбикормом «Гроуэр» (табл. 3) наблюдается достоверное ($p = 0.05$) увеличение привесов (на 12.34% и 22.93% соответственно), потребления корма (14.94% и 14,06% соответственно) и конверсии корма у опытной группы 1 (на 2.07%) и снижение у опытной группы 2

Табл. 1

Влияние спор *B. subtilis* GM2 и GM5 на рост и развитие цыплят-бройлеров кросса Кобб 500 (среднее значение $\pm t_{0,05} \cdot SE$)

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа 1, получающая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM2	Опытная группа 2, получающая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM5
Прирост массы тела (г) на 1 цыпленка			
0–10 сутки	200.33 \pm 3.70*	221.43 \pm 4.52*	222.03 \pm 3.98*
11–20 сутки	354.50 \pm 7.56*	398.26 \pm 6.58*	435.80 \pm 8.17*
21–42 сутки	1532.33 \pm 13.37*	1598.81 \pm 11.18*	1717.00 \pm 14.00*
Привес на 42-е сутки	2087.16 \pm 16.81*	2218.50 \pm 14.98*	2374.83 \pm 19.55*
Потребление комбикорма (г) на 1 цыпленка			
0–10 сут	333.17	372.80	369.80
11–20 сут	853.23	980.70	973.20
21–42 сут	3363.00	3371.00	3366.00
Итого	4349.40	4724.50	4709.00
Конверсия корма			
0–10 сутки	1.67 \pm 0.03	1.68 \pm 0.04	1.67 \pm 0.04
11–20 сутки	2.41 \pm 0.04*	2.46 \pm 0.04*	2.23 \pm 0.04*
21–42 сутки	2.19 \pm 0.02*	2.13 \pm 0.01*	1.96 \pm 0.01*
Итого	2.08 \pm 0.01*	2.13 \pm 0.01*	1.98 \pm 0.01*
Количество поголовья (шт.)	30	30	30
Сохранность поголовья (%)	100	100	100
Среднесуточный привес (г)	49.69 \pm 0.4*	52.82 \pm 0.36*	56.54 \pm 0.47*
Индекс продуктивности	244.31 \pm 2.02*	253.26 \pm 1.96*	291.25 \pm 2.48*

* Значение достоверно отличается от показателей опытной и контрольной группы

Табл. 2

Состав гранулированного комбикорма «Стартер» (0–10-й день)

Показатели качества			Дополнительно введено БАВ/кг комбикорма		
Наименование	Ед. изм	Расчет	Наименование	Ед. изм	Расчет
ОЭ птицы табл.	Ккал/100 г	305	Витамин А	тыс. МЕ/кг	14.40
Сырой протеин	%	23.00	Витамин D3	тыс. МЕ/кг	4.80
Сырой жир	%	5.15	Витамин Е	мг/кг	72.00
Сырая клетчатка	%	3.55	Витамин К3	мг/кг	2.40
Лизин	%	1.43	Витамин В1	мг/кг	2.40
Метионин + цистин	%	1.08	Витамин В2	мг/кг	9.60
Треонин	%	0.98	Витамин В3	мг/кг	36.00
Са	%	1.00	Витамин В4	мг/кг	600.00
Р	%	0.83	Витамин В5	мг/кг	12.00
Р усвояемый	%	0.48	Витамин В6	мг/кг	3.60
К	%	0.76	Витамин В12	мг/кг	0.03
Na	%	0.17	Витамин Вc	мг/кг	0.60
			Витамин Н	мг/кг	0.12
			Fe	мг/кг	30.00
			Cu	мг/кг	12.00
			Zn	мг/кг	96.00
			Mn	мг/кг	96.00
			Co	мг/кг	1.20
			I	мг/кг	0.84

Табл. 3

Состав комбикорма «Гроуэр» (11–21-й день) в виде крупки

Показатели качества			Дополнительно введено БАВ/кг комбикорма		
Наименование	Ед. изм	Расчет	Наименование	Ед. изм	Расчет
ОЭ птицы табл.	Ккал/100 г	307	Витамин А	тыс. МЕ/кг	12.00
Сырой протеин	%	21.70	Витамин D3	тыс. МЕ/кг	4.00
Сырой жир	%	5.99	Витамин Е	мг/кг	60.00
Сырая клетчатка	%	3.73	Витамин К3	мг/кг	2.00
Лизин	%	1.32	Витамин В1	мг/кг	2.00
Метионин + цистин	%	1.01	Витамин В2	мг/кг	8.00
Треонин	%	0.90	Витамин В3	мг/кг	30.00
Са	%	0.91	Витамин В4	мг/кг	500.00
Р	%	0.82	Витамин В5	мг/кг	10.00
Р усвояемый	%	0.48	Витамин В6	мг/кг	3.00
К	%	0.71	Витамин В12	мг/кг	0.025
Na	%	0.20	Витамин Вc	мг/кг	0.50
			Витамин Н	мг/кг	0.10
			Fe	мг/кг	25.00
			Cu	мг/кг	10.00
			Zn	мг/кг	80.00

(на 7.47%) по сравнению с цыплятами контрольной группы. Сравнение показателей опытных групп показало следующее: в группе 2 имеет место достоверное повышение привеса (на 9.43%), и снижение конверсии корма (на 9.36%).

При кормлении комбикормом «Финишер», состав которого представлен в табл. 4, с 21-е по 42-е сутки наблюдается достоверное ($p = 0.05$) увеличение привесов (на 4.3% и 12.05% соответственно). При этом количество потребленного корма было на уровне контрольной группы, конверсия корма в обеих опытных группах снижалась (на 2.74% и 10.51% соответственно) по сравнению с цыплятами контрольной группы. Сравнение показателей опытных групп позволяет сделать следующие выводы: в группе 2 наблюдается достоверное повышение привеса (на 7.39%), и снижение конверсии корма (на 7.98%).

Таким образом, прирост живой массы цыплят в обеих опытных группах на 42-е сутки был достоверно выше ($p = 0.05$), чем в контрольной группе (на 6.30% и 13.78% соответственно). Потребление комбикормов за весь период откорма также превышало аналогичные показатели контрольной группы на 8.62% и 8.27%. В течение всего эксперимента значения конверсии корма в опытной группе 1 были достоверно выше (на 2.40%) по сравнению с контрольной группой, а в опытной группе 2 – ниже (на 4.81%). При сравнении показателей опытных групп 1 и 2 было выявлено достоверное повышение привеса (на 7.05%) и снижение конверсии корма (на 7.04%) в группе 2.

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать вывод о том, что добавление спор бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 в комбикорм цыплят-бройлеров оказывает положительное влияние на их показатели потребления корма, что может быть обусловлено пробиотическими свойствами данных бактерий (поддержание полезной микрофлоры, улучшение пищеварения и повышение активности синтеза кишечных ферментов).

Табл. 4

Состав гранулированного комбикорма «Финишер» (21–42-й день)

Показатели качества			Дополнительно введено БАВ/кг комбикорма		
Наименование	Ед. изм	Расчет	Наименование	Ед. изм	Расчет
ОЭ птицы табл.	Ккал/100 г	311	Витамин А	тыс. МЕ/кг	12.00
Сырой протеин	%	18.00	Витамин D3	тыс. МЕ/кг	4.00
Сырой жир	%	6.48	Витамин Е	мг/кг	60.00
Сырая клетчатка	%	4.77	Витамин К3	мг/кг	2.00
Лизин	%	1.08	Витамин В1	мг/кг	2.00
Метионин + цистин	%	0.86	Витамин В2	мг/кг	8.00
Треонин	%	0.77	Витамин В3	мг/кг	30.00
Са	%	0.91	Витамин В4	мг/кг	500.00
Р	%	0.74	Витамин В5	мг/кг	10.00
Р усвояемый	%	0.40	Витамин В6	мг/кг	3.00
К	%	0.60	Витамин В12	мг/кг	0.025
Na	%	0.15	Витамин Вc	мг/кг	0.50
Cl	%	0.20	Витамин Н	мг/кг	0.10
			Fe	мг/кг	25.00
			Cu	мг/кг	10.00
			Zn	мг/кг	80.00
			Mn	мг/кг	80.00
			Co	мг/кг	1.00
			I	мг/кг	0.70

Сделанные нами выводы согласуются с широко распространенной в настоящее время практикой применения в животноводстве пробиотиков на основе *B. subtilis* в качестве промотора роста, обладающего рядом преимуществ: они являются антагонистами патогенных микроорганизмов, а также продуцируют ферменты, различные аминокислоты и естественные антибиотики. Доказано, что кормление пробиотиком на основе бактерий *B. subtilis* помогает поддерживать полезную микрофлору кишечника, повышает устойчивость организма-хозяина к кишечным патогенам, таким как *Salmonella* и *Campylobacter*, увеличивает прирост массы тела за счет улучшения конверсии корма [33]. В.А. Авад в совместном исследовании с коллегами [34, 35] показали, что пробиотики способны увеличивать высоту ворсинок эпителия кишечника, что в свою очередь обеспечивает большую площадь поверхности для эффективного поглощения питательных веществ и, как следствие, приводит к увеличению потребления и усвояемости комбикормов.

В работе Дж.Х. Парк и И.Х. Ким [36] было установлено, что в результате применения *B. subtilis* В2А в качестве пробиотика при кормлении цыплят-бройлеров кросса Росс 308 конверсия корма снижалась на 28-е сутки откорма на 7.80% относительно контроля.

За время проведения эксперимента сохранность поголовья птиц всех групп составила 100%, заболеваний в ходе ветеринарного осмотра не обнаружено. Среднесуточный привес у цыплят опытных групп 1 и 2 составил 52.82 ± 0.36 г и 56.54 ± 0.47 г и был выше, чем в контрольной группе (49.69 ± 0.40 г) на 6.30% и 13.79% ($p = 0.05$) соответственно. Европейский индекс продуктивности – 244.31 ± 2.02 в контрольной группе, а в опытных группах 1 и 2 – 253.26 ± 1.96 и 291.25 ± 2.48 ($p = 0.05$) соответственно.

Табл. 5

Микробиологический анализ содержимого тонкого и слепого кишечника цыплят-бройлеров

Показатели	Контрольная группа, получавшая комбикорм	Опытная группа 1, получавшая комбикорм+ <i>B. subtilis</i> GM2	Опытная группа 2, получавшая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM5
КОЕ/г содержимого тонкой кишки			
МКБ	$(2.0-9.0) \cdot 10^2$	$(1.2-3.5) \cdot 10^4$	$(3.0-4.2) \cdot 10^4$
БГКП	$(2.0-3.0) \cdot 10^2$	$(2.0-7.0) \cdot 10^3$	$(0.8-3.3) \cdot 10^3$
ОМЧ	$(3.0-8.3) \cdot 10^4$	$(4.0-5.5) \cdot 10^5$	$(2.5-7.5) \cdot 10^5$
КОЕ/г содержимого слепой кишки			
МКБ	$(1.8-3.8) \cdot 10^5$	$(5.6-6.8) \cdot 10^5$	$(4.3-7.1) \cdot 10^5$
БГКП	$(0.5-1.4) \cdot 10^5$	$(2.3-3.2) \cdot 10^4$	$(0.9-1.1) \cdot 10^5$
ОМЧ	$(6.0-6.7) \cdot 10^8$	$(0.4-2.8) \cdot 10^8$	$(5.3-7.1) \cdot 10^8$

МКБ – молочнокислые бактерии; БГКП – бактерии группы кишечной палочки; ОМЧ – общее микробное число.

В обеих группах цыплят, получавших пробиотики на основе спор бацилл в качестве добавки в полнорационный комбикорм, было оптимизировано потребление корма, что выражалось в увеличении показателей интенсивности поедания корма и повышении прироста массы тела цыплят. Необходимо отметить, что потребление пробиотика на основе спор *B. subtilis* GM5 повышало усвояемость кормов, а добавление в комбикорм спор *B. subtilis* GM2 приводило к увеличению конверсии корма. Результаты настоящей работы согласуются с данными других исследований о том, что штаммы *B. subtilis* способны улучшать конверсию корма [37, 38].

Таким образом, применение спор *B. subtilis* GM2 и GM5 в качестве пробиотиков благотворно влияло на динамику роста цыплят-бройлеров кросса Кобб 500 и усвояемость кормов, что важно для снижения себестоимости конечного продукта.

2.2. Микробиологический анализ содержимого кишечника цыплят. Известно, что применение штаммов *B. subtilis* в качестве пробиотика модулирует микрофлору кишечника и селективно способствует росту молочнокислых бактерий [39]. Проведенный нами анализ тонкого и слепого кишечника цыплят-бройлеров контрольной и опытных групп показал, что использование пробиотиков на основе спор *B. subtilis* GM2 и GM5 приводило к увеличению количества молочнокислых бактерий (МКБ) (табл. 5). При добавлении в корм спор *B. subtilis* GM2 количество МКБ увеличивалось в 48 раз в тонком кишечнике и 2.2 раза в слепом кишечнике. Применение *B. subtilis* GM5 увеличивало количество МКБ в содержимом тонкого кишечника в 66 раз, а в слепом кишечнике – в 2 раза. При этом общее микробное число бактерий было на относительно одинаковом уровне. Применение обоих штаммов бацилл приводило к незначительному увеличению количества БГКП в тонком кишечнике.

Из содержимого слепого и тонкого кишечника цыплят были выделены и идентифицированы бактерии, относящиеся к семействам Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae и Clostridiaceae. Основные изоляты, выделенные из тонкого кишечника, представлены родами *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и *Enterococcus*. Из слепого кишечника были выделены и идентифицированы изоляты, относящиеся к родам *Enterococcus*, *Filifactor*, *Clostridium* и *Bacillus* (табл. 6).

Табл. 6

Идентификация бактерий на MALDI Bio Typer (Bruker Daltonik)

№	Источник	Вид	Значение параметра Score
1		<i>Pseudomonas fulva</i>	2.354
2	Тонкая кишка	<i>Bacillus subtilis</i>	2.158
3		<i>Enterococcus hirae</i>	2.484
4		<i>Klebsiella pneumonia</i>	2.318
5		<i>Escherichia coli</i>	2.410
6		<i>Filifactor villosum</i>	2.237
7		<i>Clostridium cadaveris</i>	2.124
8		<i>Proteus mirabilis</i>	2.333
9	Слепая кишка	<i>Bacillus subtilis</i>	2.409
10		<i>Pseudomonas fulva</i>	2.198
11		<i>Enterococcus faecium</i>	2.390
12		<i>Escherichia coli</i>	2.005
13		<i>Enterococcus hirae</i>	2.329
14		<i>Micrococcus luteus</i>	2.306

2.3. Анализ качества мяса цыплят-бройлеров. Ветеринарно-санитарная экспертиза тушек и внутренних органов цыплят опытных и контрольных групп не выявила патологоанатомических изменений. Через 24 ч с момента убоя тушки птиц из контрольной и опытных групп имели сухую корочку подсыхания беловато-желтого цвета с розоватым оттенком, мышцы были плотные, упругой консистенции, на разрезе слегка влажные, грудные – бело-розового, ножные-красноватого цвета, характерного для данного вида птицы. Запах с поверхности и в глубине разреза мышц был специфический, свойственный свежему мясу, жир был бледно-желтого цвета, упругий, эластичный без посторонних запахов.

Бульон, приготовленный из мяса цыплят-бройлеров опытных и контрольных групп, был прозрачный, ароматный и имел приятный запах. Жир присутствовал на поверхности бульона в виде крупных капель. Жареное мясо было сочное с приятным ароматом и ярко выраженным вкусом. Все исследуемые образцы бульона, а также варёного и жареного мяса получили при дегустационной максимальную оценку – 5 баллов. Подкожный и внутренний жир цыплят-бройлеров был бледно-желтого цвета, без посторонних запахов и привкусов.

Результаты физико-химических исследований мяса цыплят представлены в табл. 7, из которой видно, что значение рН в мышцах цыплят из контрольной и опытных групп изменялось в следующих пределах: белые мышцы – 5.83 ± 0.05 – 5.97 ± 0.04 соответственно; красные мышцы – 5.77 ± 0.23 – 5.91 ± 0.14 соответственно. Каких либо значительных различий внутри исследованных групп цыплят выявлено не было. Реакция на продукты первичного распада белков, аммиака и солей аммония в белых и в красных мышцах цыплят-бройлеров была отрицательной.

Известно, что активность фермента мышечной ткани – пероксидазы – проявляется при слабокислой реакции среды, сохраняющейся только в свежем и доброкачественном мясе, поэтому определение активности этого фермента является одним из важных показателей санитарной оценки качества мяса [26]. В наших опытах пероксидазная активность была положительной как в красных, так и в белых мышцах, что свидетельствует об отсутствии каких-либо отклонений в здоровье у цыплят-бройлеров перед убоем.

Табл.7

Физико-химические показатели и микробная обсемененность мяса цыплят-бройлеров

Показатели	Группы		
	Контрольная группа	Опытная группа 1, получавшая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM2	Опытная группа 2, получавшая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM5
Бедренные мышцы (красное мясо)			
Величина pH	5.84 ± 0.07	5.97 ± 0.04	5.91 ± 0.05
Реакция на пероксидазу	+	+	+
Реакция на продукты первичного распада белков	–	–	–
Реакция на аммиак и соли аммония	–	–	–
Амино-аммиачный азот, мг	0.80 ± 0.04	0.85 ± 0.03	0.78 ± 0.04
Качественная реакция на аммиак и соли аммония	–	–	–
Бактериоскопия мазков-отпечатков (клетки/поле зрения)	3.51 ± 0.17	6.20 ± 2.61	4.50 ± 1.50
Грудные мышцы (белое мясо)			
Величина pH	5.88 ± 0.10	5.91 ± 0.14	5.77 ± 0.23
Реакция на пероксидазу	+	+	+
Реакция на продукты первичного распада белков	–	–	–
Реакция на аммиак и соли аммония	–	–	–
Амино-аммиачный азот, мг	0.80 ± 0.03	0.86 ± 0.01	0.87 ± 0.05
Качественная реакция на аммиак и соли аммония	–	–	–
Бактериоскопия мазков-отпечатков (клетки/поле зрения)	4.15 ± 0.70	4.52 ± 1.17	4.37 ± 0.59

Примечание: $p < 0.05$.

Для свежего качественного мяса птицы содержание летучих жирных кислот не должно превышать 4.50 мг КОН [27]. В мясе проанализированных цыплят данный показатель находился в пределах 1.81–1.97 мг КОН. Кислотное число жира от охлаждённых и мороженых тушек всех видов сельскохозяйственных птиц, согласно требованиям, не должно превышать 1 мг КОН, перекисное число – 0.01–0.04% йода [27]. В жире цыплят контрольной группы кислотное число составляло 0.67 ± 0.04 , а у птиц опытных групп – 0.61–0.66 мг КОН. Перекисное число в жире цыплят контрольной группы составляло $(0.03 \pm 0.0001)\%$, а у птиц опытных групп – $(0.02 \pm 0.0001)\%$ йода.

При ветеринарно-санитарной экспертизе жира и определении его доброкачественности, мы установили, что перекисное и кислотное число соответствуют жиру, пригодному в пищу без ограничений.

При микроскопическом анализе глубоких слоев мышечной ткани птиц в одном поле зрения микроскопа обнаружили единичные кокки и палочки (табл. 6). Следов распада мышечных волокон не зарегистрировали.

Табл. 8

Биологическая ценность мяса исследованных цыплят-бройлеров в возрасте 42 дней

Показатели	Группы		
	Контрольная группа	Опытная группа 1, получавшая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM2	Опытная группа 2, получавшая комбикорм + <i>B. subtilis</i> GM5
Относительная биологическая ценность, %	99.1 ± 0.40	99.5 ± 0.30	100.0 ± 0.20
Токсичность патологических форм клеток, %	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.06

Как видно из данных, представленных в табл. 8, показатели относительной биологической ценности мяса цыплят опытных и контрольной групп достоверных отличий не имели. Колебание показателей происходило в пределах 99.1–100.0%. Не установлено токсичности в отношении инфузорий (в норме количество измененных форм клеток составляет от 0.1% до 1.0%).

В мясе цыплят-бройлеров не выявлено таких минеральных элементов, как свинец, кадмий, ртуть и мышьяк, что свидетельствует о соответствии мяса требованиям безопасности согласно ГОСТ [28–30].

Таким образом, мясо цыплят-бройлеров, получавших пробиотик, по органолептическим, физико-химическим и бактериоскопическим характеристикам соответствует [26].

Заключение

Использование бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 в качестве пробиотических добавок в корма цыплят-бройлеров оказывало положительный эффект на прирост их массы тела, улучшало потребление кормов, а также благоприятно влияло на микробиоту кишечника, увеличивая количество молочнокислых бактерий, играющих важную роль в пищеварении и иммунитете птицы. Известно, что микробиота кишечника является важным компонентом желудочно-кишечного тракта и обеспечивает благополучие животного-хозяина путем нормализации пищеварительных функций и развития устойчивости к болезням. Добавление *B. subtilis* GM2 и GM5 в корм не оказывало какого-либо негативного влияния на органолептические, физико-химические и бактериоскопические характеристики мяса цыплят. Использование исследуемых штаммов *B. subtilis* GM2 и GM5 в птицеводстве могут быть имеют потенциал использования в качестве пробиотиков в птицеводстве.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, и при финансовой поддержке РФФ (проект № 16-16-04062).

Литература

1. Акимов А.В. Прогноз численности мирового населения до 2050 г. и трудосберегающие технологии // Восточная аналитика. – 2015. – № 5 – С. 9–26.

2. *Markowiak P., Śliżewska K.* The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition // *Gut Pathog.* – 2018. – V. 10. – Art. 21, P. 1–20. – doi: 10.1186/s13099-018-0250-0.
3. *Truszczyński M., Pejsak Z.* Wpływ stosowania u zwierząt antybiotyków na lekooporność bakterii chorobotwórczych dla człowieka // *Med. Weter.* – 2006. – V. 62. – P. 1339–1343.
4. *Biernasiak J., Śliżewska K., Libudziś Z.* Negatywne skutki stosowania antybiotyków // *Postepy Nauk Roln.* – 2010. – V. 3. – P. 105–117.
5. *FAO.* Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. – London, Ontario, Canada, 2002. – 11 P.
6. *Griggs J.P., Jacob J.P.* Alternatives to antibiotics for organic poultry production // *J. Appl. Poult. Res.* – 2005. – V. 14, No 4. – P. 750–756. – doi: 10.1093/japr/14.4.750.
7. *Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р.* Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2017. – Т. 159, кн. 1. – С. 85–107.
8. *Wine E., Gareau M.G., Johnson-Henry K., Sherman P.M.* Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – V. 300, No 1. – P. 146–152. – doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01781.x.
9. *Zhao P.Y., Kim I.H.* Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs // *Anim. Feed Sci. Technol.* – 2015. – V. 200. – P. 86–92. – doi: 10.5713/ajas.2006.587.
10. *Williams C.H., Witherly S.A., Buddington R.K.* Influence of dietary neosugar on selected bacterial groups of the human faecal microbiota // *Microb. Ecol. Health Dis.* – 1994. – V. 7, No 2. – P. 91–97. – doi: 10.3109/08910609409141577.
11. *Haghighi H.R., Gong J., Gyles C.L., Hayes M.A., Sanei B., Parvizi P., Gisavi H., Chambers J.R., Sharif Sh.* Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2005. – V. 12, No 12. – P. 1387–1392. – doi: 10.1128/CDLI.12.12.1387-1392.2005.
12. *Silva P.T., Fries L.L.M., Menezes C.R., Silva C.B., Soriani H.H., Bastos J.O., Motta M.H., Ribeiro R.F.* Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento // *Ciênc. Rural.* – 2015. – V. 45, No 7. – P. 1342–1347. – doi: 10.1590/0103-8478cr20140211.
13. *Quartieri A., Simone M., Gozzoli C., Popovic M., D’Auria G., Amaretti A., Raimondi S., Rossi M.* Comparison of culture-dependent and independent approaches to characterize fecal bifidobacteria and lactobacilli // *Anaerobe.* – 2016. – V. 38. – P. 130–137. – doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.006.
14. *Santini C., Baffoni L., Gaggia F., Granata M., Gasbarri R., Di Gioia D., Biavati B.* Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni* // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – V. 141, Suppl. – P. S98–S108. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.039.
15. *Barbosa T., Serra C.R., La Ragione R., Woodward M., Henriques A.* Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, No 2. – P. 968–978. – doi: 10.1128/AEM.71.2.968-978.2005.
16. *Guo X., Li D., Lu W., Piao X., Chen X.* Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2006. – V. 90. – P. 139–146. – doi: 10.1007/s10482-006-9067-9.

17. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals // J. Appl. Microbiol. – 2006. – V. 101, No 3. – P. 514–525. – doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.
18. Chaiyawan N., Taveeteptaikul P., Wannissorn B., Ruengsomwong S., Klungsunya P., Buaban W., Itsaranuwat P. Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler // Thai J. Vet. Med. – 2010. – V. 40, No 2. – P. 207–214.
19. Shivaramaiah S., Pumford N.R., Morgan M.J., Wolfenden R.E., Wolfenden A.D., Torres-Rodríguez A., Hargis B.M., Téllez G. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry // Poult. Sci. – 2011. – V. 90, No 7. – P. 1574–1580. – doi: 10.3382/ps.2010-00745.
20. La Ragione R.M., Woodward M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens // Vet. Microbiol. – 2003. – V. 94, No 3. – P. 245–256. – doi: org/10.1016/S0378-1135(03)00077-4.
21. Lee K.W., Lee S.H., Lillehoj H.S., Li G.X., Jang S.I., Babu U.S., Park M.S., Kim D.K., Lillehoj E.P., Neumann A.P., Rehberger T.G., Siragusa G.R. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens // Poult. Sci. – 2010. – V. 89, No 2. – P. 203–216. – doi: 10.3382 / ps.2009-00418.
22. Knap I., Kehlet A.B., Bennedsen M., Mathis G.F., Hofacre C.L., Lumpkins B.S., Jensen M.M., Raun M., Lay A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers // Poult. Sci. – 2011. – V. 90, No 8. – P. 1690–1694. – doi: 10.3382 / ps.2010-01056.
23. Sumi C., Yang B., Yeo I.C., Hahm Y. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics // Can. J. Microbiol. – 2015. – V. 61, No 2. – P. 93–103. – doi: 10.1139/cjm-2014-0613.
24. Lee K., Lillehoj H.S., Jang S.I., Lee S.H., Bautista D.A., Siragusa G.R. Effect of *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials on immune status in broiler chickens raised on fresh or used litter // Asian-Australas. J. Anim. Sci. – 2013. – V. 26, No 11. – P. 1592–1597. – doi: 10.5713/ajas.2013.13178.
25. Хадиева Г.Ф., Лутфуллин М.Т., Мочалова Н.К., Ленина О.А., Шарипова М.Р., Марданова А.М. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 4. – С. 356–365. – doi: 10.1134/S0026365618040110.
26. Mardanova A.M., Hadieseva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi // Agric. Sci. – 2017. – V. 8. – P. 1–20. – doi: 10.4236/as.2017.81001.
27. ГОСТ 7702.0-74 Мясо птицы. Методы отбора образцов. Органолептические методы оценки качества. – 1975. – С. 19–21.
28. ГОСТ 33824-2016 Инверсионно-вольтамперометрический метод определения содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка) – 2017. – С. 46.
29. ГОСТ Р 56931-2016 Вольтамперометрический метод определения содержания ртути. – 2017. – С. 23.
30. ГОСТ 31628-2012 Инверсионно-вольтамперометрический метод определения массовой концентрации мышьяка. – 2013. – С. 28.
31. ГОСТ 9959-2015 Мясо и мясные продукты. Общие условия проведения органолептической оценки (с поправкой). – 2017. – С. 33.
32. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
33. Grant A., Gay C.G., Lillehoj H.S. *Bacillus* spp. as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry // Avian Pathol. – 2018. – V. 47, No 4. – P. 339–351. – doi: 10.1080/03079457.2018.1464117.

34. Awad W.A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S., Böhm J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens // *Poult. Sci.* – 2009. – V. 88, No 1. – P. 49–56. – doi: 10.3382/ps.2008-00244.
35. Awad W.A., Ghareeb K., Böhm J. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* – 2010. – V. 94, No 4. – P. 486–494. – doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00933.x.
36. Park J.H., Kim I.H. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks // *Poult. Sci.* – 2014. – V. 93, No 8. – P. 2054–2059. – doi: 10.3382/ps.2013-03818.
37. Edens F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: Probiotics // *Braz. J. Poult. Sci.* – 2003. – V. 5. – P. 75–97. – doi: 10.1590/S1516-635X2003000200001.
38. Pelícia K., Mendes A.A., Saldanha E.S.P.B., Pizzolante C.C., Takahashi S.E., Moreira J., Garcia R.G., Quinteiro R.R., Paz I.C.L.A., Komiyama C.M. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens // *Braz. J. Poult. Sci.* – 2004. – V. 6, No 3. – P. 163–169. – doi: 10.1590/S1516-635X2004000300006.
39. Knarreborg A., Brockmann E., Høybye K., Knap I., Lund B., Milora N., Leser T.D. *Bacillus subtilis* (DSM17299) modulates the ileal microbial communities and improves growth performance in broilers // *Int. J. Prebiotics Probiotics.* – 2008. – V. 3, No 2. – P. 83–88.

Поступила в редакцию
18.12.18

Хадиева Гузель Фанисовна, аспирант кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: g.h95@mail.ru

Лутфуллин Марат Тафкилевич, аспирант кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: lutfullin.marat2012@yandex.ru

Николаева Анастасия Александровна, студент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: azazel1212@rambler.ru

Мочалова Найля Касимовна, инженер кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

Смоленцев Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры технологии хранения и переработки продукции растениеводства

Марийский государственный университет
пл. Ленина, д. 1, г. Йошкар-Ола, 424000, Россия
E-mail: Smolentsev82@mail.ru

Марданова Айслу Миркасымовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mardanovaayslu@mail.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: marsharipova@gmail.com

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489

**The Effect of *Bacillus subtilis* GM2 and GM5 Probiotics
on the Growth and Fodder Digestibility of Broiler Chickens**G.F. Khadieva^{a*}, M.T. Lutfullin^{a**}, A.A. Nikolaeva^{a***}, N.K. Mochalova^a,
S.Yu. Smolentsev^{b****}, A.M. Mardanova^{a*****}, M.R. Sharipova^{a*****}^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia^bMari State University, Yoshkar-Ola, 424000 RussiaE-mail: *g.h95@mail.ru, **lutfullin.marat2012@yandex.ru, ***azazel1212@rambler.ru,
****Smolentsev82@mail.ru, *****mardanovaayslu@mail.ru, *****marsharipova@gmail.com

Received December 18, 2018

Abstract

The probiotic properties of the *Bacillus subtilis* GM2 and GM5 strains were studied on 90 Cobb 500 broiler chickens aged one day that were randomly divided into three groups: the control group with the standard diet and two experimental groups (30 chickens per group) with the diet supplemented with *B. subtilis* GM2 (group 1) and GM5 (group 2) spores. The addition of *B. subtilis* GM2 and GM5 spores at a concentration of $1 \cdot 10^7$ CFU/g to the ration of broiler chickens improved their growth rate, as well as increased the digestibility of nutrients and modulated the intestinal microflora in them. The use of probiotics stimulated an increase in the live weight of chickens by 6.30% and 13.78% ($p = 0.05$) as compared with the control group. The average daily weight gain in experimental groups 1 and 2 amounted to 52.82 ± 0.36 g and 56.54 ± 0.47 g per chicken, which is more than in the control group (49.69 ± 0.40 g) – by 6.30% and 13.79% ($p = 0.05$), respectively. The administration of probiotics by feeding favored an increase in the population of lactic acid bacteria in the small and large (to a lesser extent) intestine – bacteria belonging to the Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, and Clostridiaceae families were isolated from the intestinal contents and identified. The veterinary-sanitary examination found that the meat of broiler chickens from the experimental groups meets all the GOST requirements for organoleptic, physico-chemical, and bacterioscopic characteristics. Thus, probiotics based on the *B. subtilis* GM2 and GM5 strains have a positive effect on the growth and fodder digestibility of broiler chickens.

Keywords: probiotics, *Bacillus subtilis* GM2, *Bacillus subtilis* GM5, broiler chickens, productivity, intestinal microbiota

Acknowledgments. The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University and supported by the Russian Science Foundation (project no. 16-16-04062).

References

1. Akimov A.V. World population forecast up to 2050 and labor saving technologies. *Vost. Anal.*, 2015, no. 5, pp. 9–26. (In Russian)
2. Markowiak P., Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.*, 2018, vol. 10, art. 21, pp. 1–20. doi: 10.1186 / s13099-018-0250-0.
3. Truszczyński M., Pejsak Z. Wpływ stosowania u zwierząt antybiotyków na lekooporność bakterii chorobotwórczych dla człowieka. *Med. Weter.*, 2006, vol. 62, pp. 1339–1343. (In Polish)
4. Biernasiak J., Śliżewska K., Libudzisz Z. Negatywne skutki stosowania antybiotyków. *Postepy Nauk Roln.*, 2010, vol. 3, pp. 105–117. (In Polish)
5. *FAO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.* London, Ontario, Canada, 2002. 11 p.

6. Griggs J.P., Jacob J.P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J. Appl. Poult. Res.*, 2005, vol. 14, no. 4, pp. 750–756. doi: 10.1093/japr/14.4.750.
7. Feoktistova N.V., Mardanova A.M., Hadijeva G.F., Sharipova M.R. Probiotics based on bacteria from the genus *Bacillus* in poultry breeding. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 1, pp. 85–107. (In Russian)
8. Wine E., Gareau M.G., Johnson-Henry K., Sherman P.M. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, vol. 300, no. 1, pp. 146–152. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01781.x.
9. Zhao P.Y., Kim I.H. Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2015, vol. 200, pp. 86–92. doi: 10.5713/ajas.2006.587.
10. Williams C.H., Witherly S.A., Buddington R.K. Influence of dietary neosugar on selected bacterial groups of the human faecal microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 1994, vol. 7, no. 2, pp. 91–97. doi: 10.3109/08910609409141577.
11. Haghghi H.R., Gong J., Gyles C.L., Hayes M.A., Sanei B., Parvizi P., Gisavi H., Chambers J.R., Sharif Sh. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, vol. 12, no. 12, pp. 1387–1392. doi: 10.1128/CDLI.12.12.1387-1392.2005.
12. Silva P.T., Fries L.L.M., Menezes C.R., Silva C.B., Soriani H.H., Bastos J.O., Motta M.H., Ribeiro R.F. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciênc. Rural.*, 2015, vol. 45, no. 7, pp. 1342–1347. doi: 10.1590/0103-8478cr20140211. (In Portuguese)
13. Quartieri A., Simone M., Gozzoli C., Popovic M., D'Auria G., Amaretti A., Raimondi S., Rossi M. Comparison of culture-dependent and independent approaches to characterize fecal bifidobacteria and lactobacilli. *Anaerobe*, 2016, vol. 38, pp. 130–137. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.10.006.
14. Santini C., Baffoni L., Gaggia F., Granata M., Gasbarri R., Di Gioia D., Biavati B. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, vol. 141, suppl., pp. S98–S108. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.039.
15. Barbosa T., Serra C.R., La Ragione R., Woodward M., Henriques A. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 2, pp. 968–978. doi: 10.1128/AEM.71.2.968-978.2005.
16. Guo X., Li D., Lu W., Piao X., Chen X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, vol. 90, pp. 139–146. doi: 10.1007/s10482-006-9067-9.
17. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, vol. 101, no. 3, pp. 514–525. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.
18. Chaiyawan N., Taveeteptaikul P., Wannissorn B., Ruengsomwong S., Klungsunya P., Buaban W., Itsaranuwat P. Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler. *Thai J. Vet. Med.*, 2010, vol. 40, no. 2, pp. 207–214.
19. Shivaramaiah S., Pumford N.R., Morgan M.J., Wolfenden R.E., Wolfenden A.D., Torres-Rodríguez A., Hargis B.M., Téllez G. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. *Poult. Sci.*, 2011, vol. 90, no. 7, pp. 1574–1580. doi: 10.3382/ps.2010-00745.
20. La Ragione R.M., Woodward M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet. Microbiol.*, 2003, vol. 94, no. 3, pp. 245–256. doi: org/10.1016/S0378-1135(03)00077-4.
21. Lee K.W., Lee S.H., Lillehoj H.S., Li G.X., Jang S.I., Babu U.S., Park M.S., Kim D.K., Lillehoj E.P., Neumann A.P., Rehberger T.G., Siragusa G.R. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 2010, vol. 89, no. 2, pp. 203–216. doi: 10.3382 / ps.2009-00418.
22. Knap I., Kehlet A.B., Bennedsen M., Mathis G.F., Hofacre C.L., Lumpkins B.S., Jensen M.M., Raun M., Lay A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poult. Sci.*, 2011, vol. 90, no. 8, pp. 1690–1694. doi: 10.3382 / ps.2010-01056.
23. Sumi C., Yang B., Yeo I.C., Hahm Y. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.*, 2015, vol. 61, no. 2, pp. 93–103. doi: 10.1139/cjm-2014-0613.

24. Lee K., Lillehoj H.S., Jang S.I., Lee S.H., Bautista D.A., Siragusa G.R. Effect of *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials on immune status in broiler chickens raised on fresh or used litter. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2013, vol. 26, no. 11, pp. 1592–1597. doi: 10.5713/ajas.2013.13178.
25. Khadieva G.F., Lutfullin M.T., Mochalova N.K., Lenina O.A., Sharipova M.R., Mardanov A.M. New *Bacillus subtilis* strains as promising probiotics. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 4, pp. 463–471. doi: 10.1134/S0026261718040112.
26. Mardanov A.M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agric. Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 1–20. doi: 10.4236/as.2017.81001.
27. State Standard 7702.0-74 Poultry meat. Methods of sampling. Organoleptic methods of quality assessment, 1975, pp. 19–21. (In Russian)
28. State Standard 33824-2016 Foodstuffs and food ingredients. Stripping voltammetric method for determination of toxic elements (cadmium, lead, copper and zinc), 2017, pp. 46. (In Russian)
29. State Standard 56931-2016 Foodstuffs and food raw materials. Voltammetric method of mercury content determination, 2017, pp. 23. (In Russian)
30. State Standard 31628-2012 Food-stuffs and food raw materials. Anodic stripping voltammetric method of arsenic mass concentration determination, 2013, pp. 28. (In Russian)
31. State Standard 9959-2015 Meat and meat products. General conditions of organoleptical assessment (with amendments), 2017, pp. 33. (In Russian)
32. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh* [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad, Medgiz, 1962. 180 p. (In Russian)
33. Grant A., Gay C.G., Lillehoj H.S. *Bacillus* spp. as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. *Avian Pathol.*, 2018, vol. 47, no. 4, pp. 339–351. doi: 10.1080/03079457.2018.1464117.
34. Awad W.A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S., Böhm J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult. Sci.*, 2009, vol. 88, no. 1, pp. 49–56. doi: 10.3382/ps.2008-00244.
35. Awad W.A., Ghareeb K., Böhm J. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2010, vol. 94, no. 4, pp. 486–494. doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00933.x.
36. Park J.H., Kim I.H. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poult. Sci.*, 2014, vol. 93, no. 8, pp. 2054–2059. doi: 10.3382/ps.2013-03818.
37. Edens F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: Probiotics. *Braz. J. Poult. Sci.*, 2003, vol. 5, pp. 75–97. doi: 10.1590/S1516-635X2003000200001.
38. Pelicia K., Mendes A.A., Saldanha E.S.P.B., Pizzolante C.C., Takahashi S.E., Moreira J., Garcia R.G., Quinteiro R.R., Paz I.C.L.A., Komiyama C.M. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. *Braz. J. Poult. Sci.*, 2004, vol. 6, no. 3, pp. 163–169. doi: 10.1590/S1516-635X2004000300006.
39. Knarreborg A., Brockmann E., Høybye K., Knap I., Lund B., Milora N., Leser T.D. *Bacillus subtilis* (DSM17299) modulates the ileal microbial communities and improves growth performance in broilers. *Int. J. Prebiotics Probiotics*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 83–88.

Для цитирования: Хадиева Г.Ф., Лутфуллин М.Т., Николаева А.А., Мочалова Н.К., Смоленцев С.Ю., Марданова А.М., Шарипова М.Р. Влияние пробиотиков *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 на рост и усвояемость кормов у цыплят-бройлеров // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 472–489. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489.

For citation: Khadieva G.F., Lutfullin M.T., Nikolaeva A.A., Mochalova N.K., Smolencev S.Y., Mardanov A.M., Sharipova M.R. The effect of *Bacillus subtilis* GM2 and GM5 probiotics on the growth and fodder digestibility of broiler chickens. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 3, pp. 472–489. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.472-489. (In Russian)