

УДК 636.5.033

DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.152

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГАММА-ОКТАНОЛАКТОНА В РАЦИОНЕ БРОЙЛЕРОВ: МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА

Дускаев Г.К. - д.б.н., глав. науч. сотр. отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина (ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН), Русакова Е.А. - к.б.н., ст. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований в животноводстве (ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН),

Дерябин Д.Г. – д.м.н., гл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований в животноводстве (ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН)

Ключевые слова: бройлеры, гамма-октанолактон, секвенирование, кишечная микробиота, индексы биоразнообразия.

Key words: broilers, gamma-octalactone, sequencing, intestinal microbiota, biodiversity indices

РЕФЕРАТ

Существуют опасения по поводу включения антибиотиков в корм для цыплят, из-за развития резистентности у бактерий. Именно по этой причине актуальным становится поиск добавок альтернативах антибиотикам. Одной из групп природных соединений, которые могут стать альтернативой антибиотикам, являются гамма-лактоны, которые обладают широким спектром биологической активности: антибактериальной, фунгицидной, антифидантной, рострегулирующей, аттрактантной, противоопухолевой. Доказана способность гамма-октанолактона ингибировать различные системы кворума (QS) LuxI/LuxR у бактерий. Исходя из этого, можно предположить, что использование данного вещества в рационе позволит снизить инфекции в кишечнике птицы и улучшить эффекты при выращивании бройлеров. Предполагается, что гамма-октанолактон может оказывать сходное с антибиотиками действие на патогены, снижать инвазивность у бройлеров и благоприятно влиять на микрофлору кишечника. Целью данной работы стала оценка микробиома подвздошного отдела кишечника бройлеров при введении гамма-октанолактона в рацион.

Исследование было проведено с использованием метода секвенирования. Тотальную ДНК из образцов содержимого кишечника выделяли при помощи набора FastDNA® SPIN Kit for Faeces. Парноконцевое секвенирование ампликоновых ДНК-библиотек было выполнено на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v.2 (500-cycle) (Illumina, San Diego, CA, USA).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что включение гамма-октанолактона в рацион бройлеров в дозировке 0,05 и 0,20 мл/кг ж.м./сут способствует росту числа представителей филума Firmicutes в подвздошном отделе кишечника птицы. Дозировка 0,05 мл/кг ж.м./сут способствовала снижению содержания рода *Streptococcus* на 4,21%, относительно контроля. Гамма-октанолактон в дозировке 0,20 мл/кг ж.м./сут способствует увеличению на 10% представителей родов *Lactobacillus* и *Turicibacter*, относительно контрольной группы.

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии снижают эффективность использования корма и, следовательно, влияют на рост и здоровье птицы. Антибио-

тики обычно добавляют в рацион цыплят, выращиваемых на мясо, чтобы уменьшить бактериальное загрязнение их желудочно-кишечного тракта. Однако есть

опасения по поводу включения антибиотиков в корм для цыплят, выращиваемых на мясо, из-за развития резистентности у бактерий [1]. В результате умы ученых занимают поиски альтернативных кормовых добавок. Наиболее часто используемыми альтернативами антибиотикам в бройлерном производстве являются фитогенные препараты, органические кислоты, пребиотики, пробиотики, ферменты и их производные [2]. Сообщалось, что альтернативы антибиотикам увеличивают потребление корма, стимулируют пищеварение, улучшают эффективность корма, повышают показатели роста и снижают заболеваемость за счет модуляции кишечной микробиоты и иммунной системы, ингибирования патогенов и улучшения целостности кишечника [5]. Кишечная микробиота является целью повышения пользы для здоровья и стимулирующего рост воздействия кормовых добавок на бройлеров [4]. Благодаря тому, что потребители отдают предпочтение натуральным продуктам, не содержащим антибиотиков, фитогенные препараты стали самым быстрорастущим сегментом кормовых добавок для животных и птицы [5].

Одной из интересных групп природных соединений являются гамма-лактоны, которые широко распространены в растениях особенно среди семейства *Amaranthaceae*, *Aristolochiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Canellaceae*, *Labiatae*, *Magnoliaceae*, *Lauraceae*. Эти соединения обладают широким спектром биологической активности: антибактериальной, фунгицидной, антифидантной, рострегулирующей, инсектицидной, аттрактантной, противоопухолевой [6]. В царстве Plantae гамма-лактоны описаны в качестве вкусовых и ароматических компонентов, в том числе обнаруживаемых в составе лекарственных растений, используемых традиционной (народной) медициной для терапии широкого спектра инфекционно-воспалительных состояний [7]. Гамма-капролактон как компонент шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) и цветкового растения из семей-

ства молочников *Polygala senega*, а также гамма-нонанолактон как один из компонентов дягиля даурского (*Angelica dahurica*) обладают выраженными антибактериальными свойствами [8]. Скрининг широкого спектра восточно-европейских лекарственных растений показал наиболее выраженную способность к ингибированию «кворум сенсинга» (QS) («Кворум сенсинг» – это процесс химической коммуникации между бактериальными клетками, основанный на осуществляемых ими биосинтезе, секреции, рецепции и скоординированном ответе на малые сигнальные молекулы, называемые аутоиндукторами) [9] у экстрактов коры дуба и листьев эвкалипта [10]; доказана способность гамма-октанолактона ингибировать различные системы кворума (QS) LuxI/LuxR у бактерий [11]. Исходя из этого, можно предположить, что использование данного вещества в рационе позволит снизить инфекции в кишечнике птицы и улучшить эффекты при выращивании бройлеров. Предполагается, что гамма-октанолактон может оказывать сходное с антибиотиками действие на патогены, снижать инвазивность у бройлеров и благоприятно влиять на микрофлору кишечника.

В связи с этим целью данной работы стала оценка микробиома подвздошного отдела кишечника цыплят-бройлеров при введении гамма-октанолактона в рацион, с использованием метода секвенирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009). Все процедуры над животными были выполнены в соответствии с правилами Комитета по этике животных ФНЦ БСТРАН.

Объект исследования. Цыплята-бройлеры (кросс Арбор Айтрес).

Используемые вещества. Гамма-октанолактон, 97% ALO400-8, Sigma-Aldrich (USA). Выделен из экстракта *Eucalyptus viminalis* (табл. 1).

Таблица № 1

Характеристика гамма-октанолактона

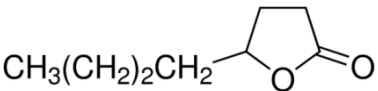
Название: Тривиальное (по IUPAC)	Брутто- формула	Структурная формула	Молярная масса
Гамма-октанолактон (5-бутилоксан-2-он)	C ₈ H ₁₄ O ₂		142,20

Схема эксперимента. Экспериментальная часть работы была проведена в условиях вивария и ЦКП ФНЦ БСТ РАН (Оренбург, Россия). Цыплята-бройлеры в возрасте 7-дней были разделены на 3 группы, n = 30. Контрольная группа – ОР; I опытная – ОР + гамма-октанолактон в дозировке 0,05 мл/кг ж.м./сут; II опытная – ОР + гамма-октанолактон в дозировке 0,2 мл/кг ж.м./сут. Кормление и поение птицы осуществлялось групповым методом согласно рекомендациям ВНИТИП. Период эксперимента – 42 дня. Исследование проведено в трёх повторностях.

Состав рациона (%): пшеница – 48; ячмень – 2,7; кукуруза – 7,6; соевый шрот (46% СР) – 25,5; подсолнечный шрот (38% СР) – 7,4; подсолнечное масло – 5,1; дикальцийфосфат – 1,7; мел кормовой – 1,0; известняк – 0,6; соль – 0,4; DL-метионин – 0,19; L-Лизин – 0,36; бикарбонат натрия – 0,12; витаминно-минеральный премикс – 2,1 (7-28 дн. возраст; далее проводилась корректировка состава рациона).

Выделение ДНК. Тотальную ДНК из образцов содержимого кишечника выделяли при помощи набора FastDNA® SPIN Kit for Faeces (MP Biomedicals Inc., Solon, OH, USA) с использованием лизирующего матрикса Lysing Matrix E.

Приготовление ДНК-библиотек и проведение секвенирования. Приготовление ДНК-библиотек выполнено в соответствии с протоколом Illumina (Part #15044223, Rev. B.). Парноконцевое секвенирование ампликоновых ДНК-библиотек было выполнено на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v.2 (500-

cycle) (Illumina, San Diego, CA, USA). Приготовление ДНК-библиотек, секвенирование и биоинформатическая обработка были выполнены в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия).

Статистический анализ проводился с использованием программы Past (Paleontological Statistics Software for Education and Data Analysis), которая использовалась для вычисления индексов биоразнообразия (индексы Симпсона и Шеннона).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ микробиома. При анализе бактериального профиля образцов содержимого подвздошной кишки цыплят-бройлеров контрольной группы было выявлено 326 операционных таксообразующих единиц (ОТЕ), которые можно отнести к 4-м филумам эубактерий, представители которых составляли 99% микрофлоры. В частности, представители филума Firmicutes составляли большинство, на их долю приходилось 86,1%, а представителей филумов Actinobacteria, Proteobacteria и Bacteroidetes, было не более 5% (4,65; 4,47 и 4,18%, соответственно от общего количества). Отдельную категорию составили микроорганизмы, которые не были классифицированы и определены в группу unclassified Bacteria. Их количество не превышало 0,60%. (рис. 1А). Оценивая микробное разнообразие более низких таксономических единиц, в контрольной группе, то можно отметить несколько минорных родов, которые представлены большим процентом микроорганизмов от общего числа: *int-*

classified *Ruminococcaceae* (21,44%), *Streptococcus* (11,39%), *Turicibacter* (6,20%), *Faecalibacterium* (5,39%), *Eisenbergiella* (4,94%), *unclassified Lachnospiraceae* (4,53%), *Rubneribacter* (4,33%), *Lactobacillus* (4,21%). В категорию Other были включены все рода, представители которых в своем количестве не превышали 1%, они в сумме составили 12,52% от общего числа микроорганизмов (рис. 1Б).

Микробный профиль цыплят-бройлеров I группы был представлен микроорганизмами, относящимся к 8-и филумам, идентифицировано 208 ОТЕ. Доминирующим филумом также, как и в контроле определен Firmicutes (93,13%), но содержание представителей данного филума на 7,0% больше, чем в контрольной группе. Бактерии, относящиеся к филумам Proteobacteria и Cyanobacteria/Chloroplast в процентном отношении, составляют около 3,50% от общего числа микроорганизмов (2,46 и 3,26%, соответственно). Филумы Bacteroidetes (0,34%), Candidatus Saccharibacteria (0,29%), Verucomicrobia (0,24%), Deinococcus-Thermus (0,14%) и Actinobacteria (0,13%) в своем количестве не превышали 1%. Другие группы бактерий, не идентифицированных в ходе исследования (unclassified Bacteria), составили не более

0,01% от общего количества (рис. 2А). При добавлении 0,05 мл/кг гамма-октаноактона увеличивается количество представителей родов *Romboutsia* (52,76%). Содержание рода *Lactobacillus* (5,57%) увеличилось на 1,36%, на фоне снижения содержания рода *Streptococcus* (7,18%) на 4,21% и незначительного снижения содержания рода *Turicibacter* (5,70%), относительно контроля. В категорию Other были включены все рода, представители которых в своем количестве не превышали 1% (рис. 2Б).

В ходе секвенирования образцов содержимого подвздошного отдела кишечника II группы идентифицировано 180 ОТЕ, которые отнесены к 5-ти филумам бактерий. Количество микроорганизмов, которые не были классифицированы, были определены в группу unclassified Bacteria, не превышало 0,08%. Доминирующее положение занимали представители филума Firmicutes, их доля составляла 94,55% от общего количества. Вторым и третьим по количеству оказались филумы Bacteroidetes (3,19%) и Proteobacteria (2,08%). Доля остальных филумов (Cyanobacteria/Chloroplast (0,06%), Actinobacteria (0,04%)) составила не более 0,1 % от общего количества (рис. 3А). В ходе проведенного исследования на более низком таксономическом уровне выявляе-

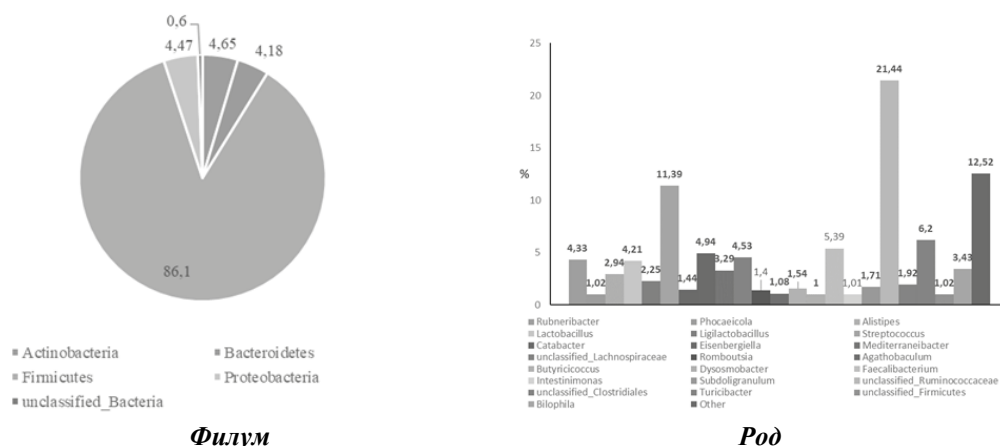


Рисунок 1. Бактериальный профиль цыплят-бройлеров контрольной группы (А – Разнообразие таксонов; Б – разнообразие родов)

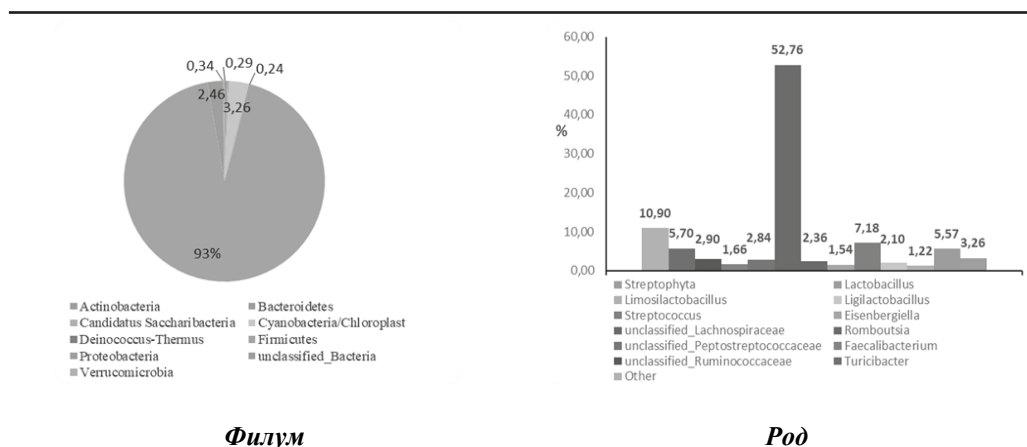


Рисунок 2. Бактериальный профиль цыплят-бройлеров I группы
(А – Разнообразие таксонов; Б – разнообразие родов)

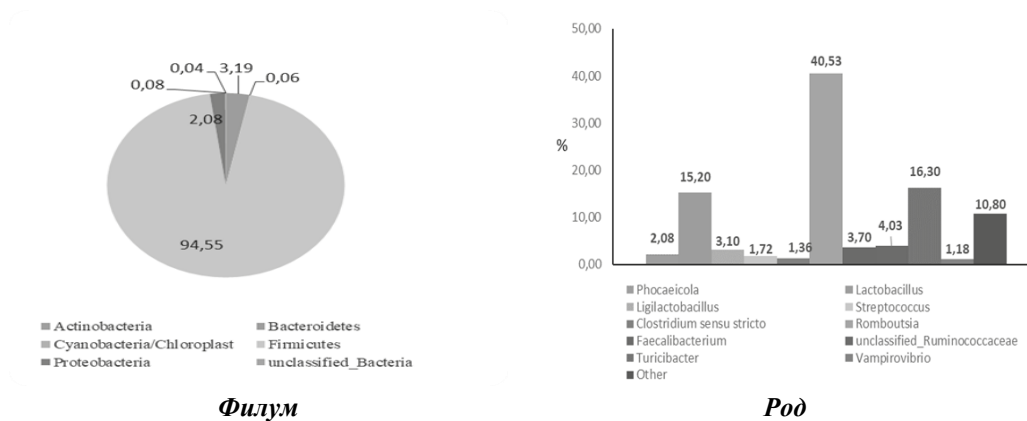


Рисунок 3. Бактериальный профиль цыплят-бройлеров II группы
(А – Разнообразие таксонов; Б – разнообразие родов)

Таблица № 2

Индексы биоразнообразия

Показатель	Группы		
	Контроль	I	II
Индекс Симпсона	0,08	0,30	0,22
Индекс Шеннона	3,15	2,15	2,18

но многообразие родов бактерий, среди которых доминирующее положение занимают *Romboutsia* (40,53%). Наблюдается увеличение на 10% представителей родов *Lactobacillus* (15,20%) и *Turicibacter* (16,30%), относительно контроля. Содержание остальных микроорганизмов (*Vampirovibrio* (1,18%), *Clostridium sensu stricto* (1,36%), *Streptococcus* (1,72%), *Phocaeicola* (2,08%), *Ligilactobacillus* (3,10%) и *Faecalibacterium* (3,70%)) колеблется от 1,18% до 3,70%. Категория Other включала в себя представителей родов, количество которых не превышало 1%, в сумме они составили 10,80% (рис. 3Б).

При анализе биологического разнообразия подвздошного отдела кишечника цыплят-бройлеров были использованы индексы Симпсона и Шеннона (табл. 2).

Индекс Симпсона является мерой связи числа степеней свободы взаимодействий (внутривидовых и межвидовых) [13]. Его значение варьируется от 0 до 1, что значит бесконечное разнообразие или его отсутствие соответственно [14]. Чем больше Индекс Симпсона, тем сильнее доминирование одного или нескольких видов. Значение индекса доминирования в контрольной группе составило 0,08, что свидетельствует о равномерности распределения видов без преобладания одного из них. Максимальное значение индекса рассчитано для I группы – 0,30, что указывает на значительное доминирование некоторых видов, а именно рода *Romboutsia*.

Индекс Шеннона суммирует количество информации о численности и видовом составе организмов, учитывая число видов и степень их доминирования. Индекс независим от биоценотического сходства сравниваемых сообществ и может быть вычислен для каждого ценоза в отдельности [13]. Индекс Шеннона отображает сложность структуры, основываясь на количестве представленного вида [15], он может изменяться от 0 до 5. Чем больше разнообразие, тем больше индекс.

Минимальное значение индекса наблюдается в I группе, что указывает на простейшее устройство сообщества мик-

робиома. Максимальный индекс рассчитан для контрольной группы – 3,15, что свидетельствует о максимальном видовом богатстве. Группы распределяются в следующем порядке: контроль – 3,15; II – 2,18; I – 2,15.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что включение гамма-окталактона в рацион бройлеров в дозировке 0,05 и 0,20 мл/кг ж.м./сут способствует росту числа представителей филума Firmicutes в подвздошном отделе кишечника птицы. Дозировка 0,05 способствовала снижения содержания рода *Streptococcus* на 4,21%, относительно контроля. Гамма-окталактон в дозировке 0,20 мл/кг ж.м./сут способствует увеличению на 10% представителей родов *Lactobacillus* и *Turicibacter*, относительно контрольной группы.

Исследования выполнены по теме НИР № FNWZ-2022-0010.

THE USING OF GAMMA-OCTANOLACTONE IN THE BROILER DIET: INTESTINAL MICROBIOME

G.K. Duskaev – Doctor of biological sciences, chief researcher, Federal Research Centre of Biological Systems and Agro-technologies of the Russian Academy of Sciences, E.A. Rusakova – Candidate of biological sciences, senior researcher, Federal Research Centre of Biological Systems and Agro-technologies of the Russian Academy of Sciences, D.G. Deryabin, Doctor of sciences, chief researcher, Federal Research Centre of Biological Systems and Agro-technologies of the Russian Academy of Sciences

ABSTRACT

It is known that the inclusion of antibiotics in chicken feed leads to the development of resistance in bacteria. It is for this reason that the search for additives to alternative antibiotics becomes relevant. The ability of gamma-glucanolactone to inhibit various quorum systems (QS) LuxI/LuxR in bacteria has been demonstrated. Based on this, it can be assumed that the use of this substance in the diet will reduce infections in the intestines of poultry and improve the effects of broiler rearing. The aim of this work was to

evaluate the microbiome of the iliac intestine of broilers when introducing gamma-octanolactone into the diet.

The study was conducted using the sequencing method. Total DNA from samples of intestinal contents was isolated using the FastDNA® Faecal Extraction Kit. Pair-end sequencing of DNA library amplicons was performed on the Illumina MiSeq Reagent Kit platform using the MiSeq v.2 Reagent Kit (500 cycles) (Illumina, San Diego, California, USA).

The inclusion of gamma-octanolactone in the diet of broilers at a dosage of 0.05 and 0.20 ml / kg w.m. / day contributes to an increase in the number of representatives of the phylum Firmicutes in the iliac intestine of poultry. The dosage of 0.05 ml / kg w.m. / day of gamma-octanolactone reduced the content of the genus *Streptococcus* by 4.21%; the dosage of 0.20 ml / kg w.m. / day of gamma-octanolactone increased by 10% representatives of the genera *Lactobacillus* and *Turicibacter*, relative to the control.

ЛИТЕРАТУРА

Eghbaldost-Jadid R. The Effects of Turnip (*Brassica rapa*) Extract on the Growth Performance and Health of Broilers / R. Eghbaldost-Jadid, M. Nosrati, B. Rasouli, A. Seidavi, C.J.C. Phillips // *Animals* (Basel) 2021;18.11(3):867. – DOI 10.3390/ani11030867.

Mehdi Y. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives / Y. Mehdi, M.P. Létourneau-Montminy, M.L. Gaucher, Y. Chorfim [et al.] // *S. Anim Nutr.* – 2018. – No 4(2). – P. 170-178. – DOI 10.1016/j.aninu.2018.03.002.

Zhu Q. Progress on Gut Health Maintenance and Antibiotic Alternatives in Broiler Chicken Production / Q. Zhu, P. Sun, B. Zhang, L. Kong, C. Xiao, Z. Song // *Front Nutr.* – 2021; 8:692839. – DOI 10.3389/fnut.2021.692839.

Habtam, A. Potential Feed Additives as Antibiotic Alternatives in Broiler Production / A. Habtam, Z. Haijun, W. Jing, Wu. Shugeng, Q. Kai [et al.] // *Front Vet Sci.* – 2022; 9:916473. – DOI 10.3389/fvets.2022.916473

Flees, J. Phytogetic feed- and water-additives improve feed efficiency in broilers via modulation of (an)orexigenic hypothalamic neuropeptide expression / J. Flees, E. Greene, B. Ganguly, S. Dridi // *Neuropeptides.* – 2020; 81:102005. – DOI 10.1016/j.npep.2020.102005.

Carey, F.A. Organic Chemistry (8th ed.) / F.A. Carey, R.M. Giuliano // New-York: McGraw-Hill, 2011. – P. 798–99.

Gottelt, M. Characterisation of a natural variant of the γ -butyrolactone signalling receptor / M. Gottelt, A. Hesketh, R. Bunet [et al.] // *BMC Res. Notes.* – 2012; 5: 379.

Lechner, D. The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica* (Bai Zhi) / D. Lechner, M. Stavri, M. Oluwatuyi [et al.] // *Phytochemistry.* – 2004. – No 65(3). – P. 331–5. – DOI 10.1016/j.phytochem.2003.11.010.

Whiteley, M. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research / M. Whiteley, S.P. Diggle, E.P. Greenberg // *Nature.* – 2017. – Vol. 551. – P. 313–320. – DOI 10.1038/nature24624.

Duskaev, G.K. Assessment of (in vitro) toxicity of quorum-sensing inhibitor molecules of quercus cortex / G.K. Duskaev, D.G. Deryabin, I.F. Karimov [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* – 2018. – No 10(1). – P. 91-95.

Duskaev, G.K. Eucalyptus viminalis leaf extract alters the productivity and blood parameters of healthy broiler chickens / G.K. Duskaev, O.V. Kvan, Sh.G. Rakhmatullin // *Vet World.* – 2020. – No 13(12). – P. 2673–2680. – DOI 10.14202/vetworld.2020.2673-2680

Klindworth, A. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies / A. Klindworth [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2013;41(1): e1. DOI 10.1093/nar/gks808.

Шитиков, В.К. Оценка биоразнообразия: попытка формального обобщения / В.К. Шитиков, Г.С. Розенберг // Структурный анализ экологических систем. Количественные методы экологии и гидробиологии. – 2005. – С. 91-121.

Розенберг, Г.С. Несколько слов об индексе разнообразия Симпсона / Г.С. Розенберг // Самарская Лука. – 2007. – Т. 16. – №3(21). – С. 581-584.

Орлова, Ю.С. Использование индексов биологического разнообразия для анализа альгофлоры бассейна р. Алатырь / Ю.С. Орлова // ВЕСТНИК Мордовского университета. – 2013. – С. 53-56.