

УСПЕШНАЯ СТРАТЕГИЯ УПРАВЛЕНИЯ МИКРОБИОМОМ КУР

Г. ЛАПТЕВ, д-р биол. наук, генеральный директор,
Е. ЙЫЛДЫРЫМ, Л. ИЛЬИНА, В. ФИЛИППОВА, Е. ГОРФУНКЕЛЬ, А. ДУБРОВИН, И. КОЧИШ, ООО «Биотроф+»

Микробиом кишечника животных и птицы можно с уверенностью назвать центром управления организмом. Представители нормофлоры кишечника (лактобактерии, бифидобактерии, целлюлозолитики и др.) — это своего рода дополнительный орган, выполняющий незаменимые функции переваривания кормов, поддержания иммунитета, защиты от патогенов и пр. Условно-патогенная микрофлора (некоторые энтеробактерии, актиномицеты и др.) у здоровой птицы со стабильным микробиоценозом работает так же, как и нормальная. Однако на фоне гибели представителей нормофлоры и снижения иммунитета условно-патогенная микрофлора может приобретать свойства патогенности. Патогенные формы, такие как *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* и другие, являются частой причиной заболеваемости птицы и массовой ее гибели. В просвете пищеварительного канала у нее всегда присутствуют эти три группы микроорганизмов. У здоровой птицы нормальная микрофлора занимает главенствующее положение по количеству и активности, условно-патогенная проявляет весьма умеренную активность, а патогенная присутствует только в малых концентрациях. Однако при введении в рацион кормов низкого качества, загрязненных микотоксинами, а также при частой смене рационов, при заболеваемости, снижении иммунитета, нарушении условий содержания, стрессовых факторах, применении лекарственных и профилактических препаратов без доказанной эффективности условно-патогенная и патогенная микрофлора начинают получать конкурентное преимущество.

МИКРОФЛОРА ФОРМИРУЕТСЯ НА СТАДИИ ЭМБРИОНА

Традиционно считается, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) эмбрионов птицы стерilen, а формирование микробиоценоза пищеварительной системы цыплят происходит после вылупления в результате контакта с окружающей средой. Такое мнение сложилось в 1950 г., когда группа исследователей опубликовала в американском журнале «Journal of Nutrition» результаты первых экспериментов с использованием классических методов микробиологии. Давно доказано, что лишь 1–5% микробов кишечника могут расти на питательных средах. Современные молекулярно-генетические методы дают возможность изучать разнообразие микроорганизмов без сопутствующих традиционным методам микробиологии

ограничений, то есть минуя стадию культивирования. К тому же предварительное культивирование микроорганизмов с помощью классических методов микробиологии позволяет получить картину весьма отдаленную от истинной структурной организации, путях метаболизма и межмикробных взаимоотношениях бактерий в естественной среде обитания.

Наибольший вклад в познание природного разнообразия микробов внесли метагеномные методы, основанные на секвенировании участков генов 16S рРНК, которые должны быть у всех бактерий в сообществе. Одним из таких методов является T-RFLP-анализ, наиболее популярный метагеномный метод первого поколения. Однако в России T-RFLP-анализ используется только для изучения почвы и кала человека. Первыми, кто применил данный метод в 2012 г. для исследования бактерий кишечника кур, стали научные сотрудники молекулярно-генетической лаборатории ООО «Биотроф+» (г. Санкт-Петербург). Методику инициативные и молодые ученые воспроизвели и модифицировали самостоятельно. Это позволило специалистам компании «Биотроф+» сделать ряд научных открытий мирового уровня.

Так, в лаборатории ООО «Биотроф+» был проведен анализ микрофлоры хориоаллантоисных оболочек, желточных мешков и желудочно-кишечного тракта куриных эмбрионов 6-, 13-, 18- и 20-суточных периодов инкубации. Яйца инкубировали в инкубатории одной из птицефабрик Ленинградской области. Отбор проб проводили в молекулярно-генетической лаборатории ООО «Биотроф+» со строгим соблюдением стерильности. Подготовку образцов осуществляли в соответствии с требованиями Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и перерабатывающих предприятиях (рис. 1). При микробиологическом исследовании содержимого яйца поверхность скорлупы обрабатывали теплым ($30 + 2^{\circ}\text{C}$) щелочным раствором (каустическая сода 0,2%-ной концентрации) в течение 1,5–2 мин, промывали водопроводной водой, после стекания которой яйцо погружали в 70%-ный этиловый спирт. На остром конце яйца стерильными ножницами проделывали отверстие диаметром около 30 мм, содержимое выливали в стерильную чашку Петри и отделяли необходимый материал стерильными инструментами.

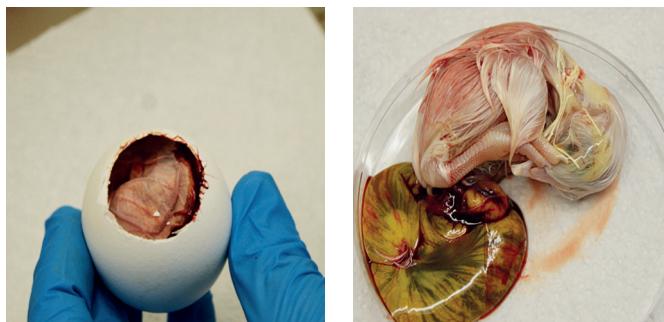


Рис. 1. Процесс отбора проб содержимого ЖКТ у куриных эмбрионов

С использованием молекулярно-генетических методов учеными компании «Биотроф+» показано, что микроорганизмы, отвечающие за адаптацию организма птицы к внешней среде, а также патогенные формы способны колонизировать организм на стадии эмбрионального развития внутри яйца. В зародышах были выявлены кислотоустойчивые бактерии родов *Megasphaera*, *Veillonella*, *Dialister*, которые синтезируют в кишечнике ЛЖК и являются типичными его обитателями у взрослой птицы. Тем не менее традиционные представители кишечной нормофлоры — лактобактерии, осуществляющие защиту от патогенов, в куриных эмбрионах обнаружены не были. На рисунке 2 приведен состав микрофлоры ЖКТ куриных эмбрионов, определенный молекулярно-генетическими методами.

Кроме того, в куриных эмбрионах были найдены кампилобактерии, среди которых нередко выявляют патогены. Например, у курчаще всего обнаруживают болезнетворные бактерии *C. jejuni*. Этот микроорганизм может вызывать снижение прироста массы бройлеров и яйценоскости курнесушек, а также падеж цыплят. У человека вид *C. jejuni* провоцирует гастроэнтериты, по тяжести клинического течения превосходящие сальмонеллезы и шигеллезы.

Интересно, что еще в 2003 г. Щербаков Г.Г. и Коробов А.В. отмечали в своих работах, что высокое количество

типичных представителей кишечной микрофлоры птицы в яйцеводах свидетельствует о возможном проявлении обратной (ретроградной) перистальтики в процессе откладывания яиц.

Таким образом, микроорганизмы, присутствующие в ЖКТ эмбриона, являются основой, которая определяет формирование стартового кишечного биоценоза вылупившихся цыплят.

Как показано специалистами ООО «Биотроф+», в желудочно-кишечном тракте вылупившихся цыплят, не контактировавших с кормом, уже содержится значительное количество микрофлоры, разнообразной по составу.

С использованием метода количественной ПЦР показано, что общее содержание бактерий достигало 10^8 геномов/г. Разнообразие микроорганизмов было представлено лактобактериями, клостридиями, пептострептококками, целлюлозолитическими формами, стрептококками, стафилококками, энтеробактериями, дрожжами и др.

Для цыплят несколько дней перед выводом и первые дни после вылупления являются критическими для развития и выживания, поскольку в этот период в их организме происходит метаболический и физиологический переход от питания в яйце за счет желтка к сухому корму. Поэтому крайне важно своевременное моделирование природной схемы защиты цыплят с первых часов жизни в инкубатории и закрепление этого эффекта уже в птичнике, куда поступает молодняк для выращивания. Источником конкурентоспособных микроорганизмов, осуществляющих контроль над численностью патогенной микрофлоры путем вытеснения ее из кишечного микробиоценоза, могут быть пробиотические препараты.

Очевидно также, что структура микрофлоры эмбриона формируется под влиянием микробиома несушки путем вертикальной передачи с помощью бактериальной транслокации. Поэтому путь к здоровому микробиому цыплят должен начинаться с устранения дисбиотических нарушений кишечника родительского стада.

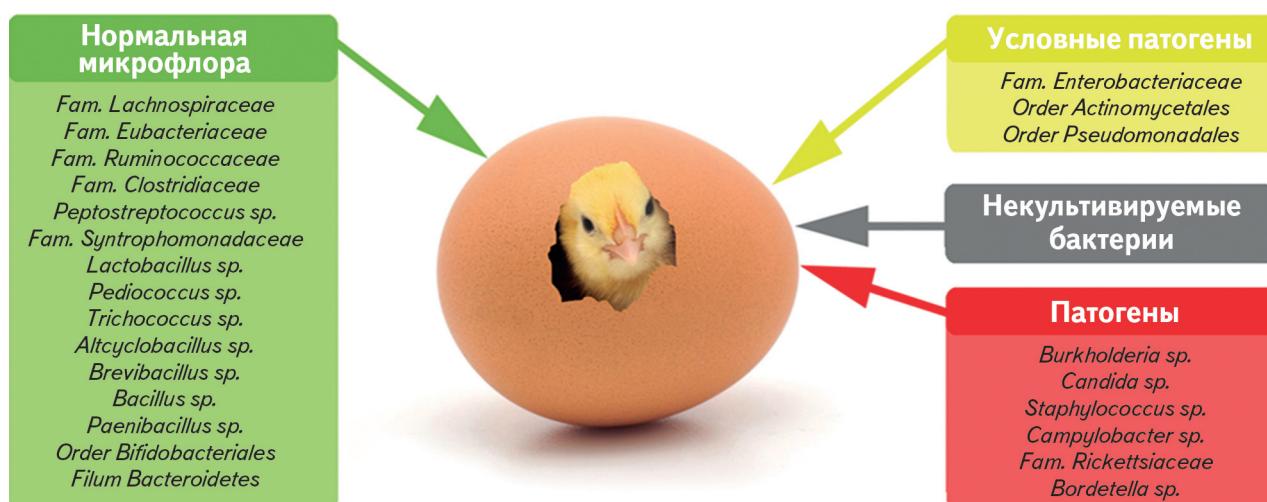


Рис. 2. Состав микрофлоры ЖКТ у куриных эмбрионов выявлен молекулярно-генетическими методами

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ МИКРОБИОМА

Мощным толчком в развитии фундаментальных исследований по анализу микробиома кишечника сельскохозяйственных животных и птицы в компании «Биотроф+» стало приобретение в начале 2018 г. высокопроизводительного секвенатора компании Illumina последнего поколения (рис. 3). Новая технология позволяет получить огромный объем данных с высокой точностью анализа

микробов — до вида за один «прогон». Например, чувствительность анализа дает возможность отличить вид *Escherichia coli* от менее вирулентного вида *Escherichia albertii*. Однако в связи с высокой стоимостью прибора, сопутствующего оборудования и реагентов NGS-секвенирование используется в России только в медицинских целях.

Учеными компании «Биотроф+» метод NGS-секвенирования уже был с упеш-

ием применен при исследовании содержимого слепых отростков кишечника родительского стада кур различного возраста на одной из крупных птицефабрик России.

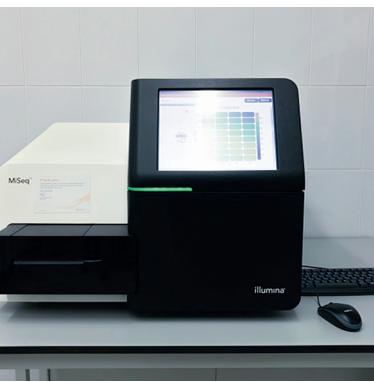


Рис. 3. Секвенатор MiSeq

в лаборатории
ООО «Биотроф+»

хом применен при исследовании содержимого слепых отростков кишечника родительского стада кур различного возраста на одной из крупных птицефабрик России.

ПРОБИОТИК ПРОФОРТ

Для нормализации состава микрофлоры у птицы в ее рацион была введена многофункциональная кормовая добавка Профорт, которая сочетает в себе свойства фермента и пробиотика. Бактериальный комплекс препарата Профорт состоит из двух штаммов бактерий, способных к синтезу молочной кислоты и цианкобаламина (витамин B_{12}). Молочная кислота стимулирует процессы регенерации кишечного эпителия, а витамин B_{12} участвует в синтезе нуклеиновых кислот и ускоряет восстановление антиоксидантов в организме, разрушающих свободные радикалы.

С использованием NGS-секвенирования был изучен состав микробиома слепых отростков кишечника птицы родительского стада в возрасте 36, 124, 181 и 351 суток. В целом продемонстрировано, что применение пробиотика Профорт способствовало оздоровлению микрофлоры слепых отростков: представители нормофлоры занимали выраженное доминирующее положение, а условно-патогенные формы были обнаружены в крайне низких концентрациях, не имеющих диагностического значения (рис. 4).

Обращает на себя внимание присутствие в кишечнике птицы всех возрастов значительных количеств (от 75,9 до 80,1%) цеплюлозолитических бактерий, в том числе клостридий, расщепляющих клетчатку. Поскольку орга-

низм кур не способен производить фермент целлюлазу, то на долю клетчатки рациона, расщепленной с участием бактерий, приходится до 80%. Ряд целлюлозолитиков (клостридии, бактероиды, лахноспирсы) также способен к расщеплению крахмалистых полисахаридов кормов. Функцией целлюлозолитических видов клостридий является также синтез бутиратта, участвующего в восстановлении кишечного эпителия и ворсинок.

Таксономическое разнообразие целлюлозолитиков было богатым и представлено бактероидами, руминококками, лахноспирасами, эубактериями, клостридиями, флавобактериями, превотеллами и прочими. Родовое разнообразие целлюлозолитиков исчислялось 203 основными родами.

Обнаруженный количественный и качественный состав целлюлозолитиков косвенно свидетельствует об эффективно протекающих процессах расщепления клетчатки в кишечнике птицы. Богатая таксономическая их представленность обеспечивала накопление необходимых разнообразных продуктов бактериального метаболизма в кишечнике.

Доля лактобактерий в слепых отростках всей исследованной птицы была высокой, достигая с возрастом 24,7%. Данные микроорганизмы в кишечнике выполняют ряд важных функций: защищают птицу от патогенов, проявляют иммуномодулирующую активность, участвуют в синтезе витаминов, незаменимых аминокислот, лактата, необходимого для образования летучих жирных кислот бактериями других групп.

Высокая точность анализа при использовании NGS-секвенирования позволила установить видовую принадлежность лактобактерий, выявить 46 видов из рода *Lactobacillus* и 23 вида прочих представителей молочно-кислых микроорганизмов: энтерококки, леуконостоки, педиококкусы, вейселлы и др. (рис. 5). Одними из доминирующих видов в составе лактобактерий кишечника были *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. reuteri*. Интересно, что вид

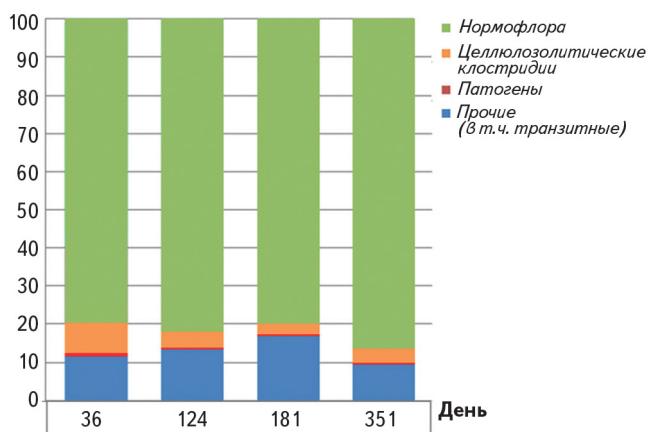


Рис. 4. Экологические группы бактерий в составе микробиома кишечника кур (метод NGS-секвенирования), %

L. helveticus продуцирует широкий спектр антимикробных пептидов, протеолитических и липополитических ферментов, активирует синтез провоспалительных цитокинов, имеет способность к адгезии, что обеспечивает высокую его приживаемость в кишечнике. *L. crispatus* обладает доказанной антимикробной активностью в отношении таких патогенов, как *Salmonella enteritidis* и *Clostridium perfringens*. Бактерия *L. reuteri* — это уникальный вид, который синтезирует антимикробный бактериоцин реутерин, эффективно угнетающий рост патогенных форм, включая кишечную палочку, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* и *Staphylococcus sp.*, а также дрожжи, грибы, вирусы. Высокий уровень разнообразия и количества лактобактерий свидетельствует об эффективно протекающих процессах подавления нежелательных и патогенных микроорганизмов в кишечнике птицы.

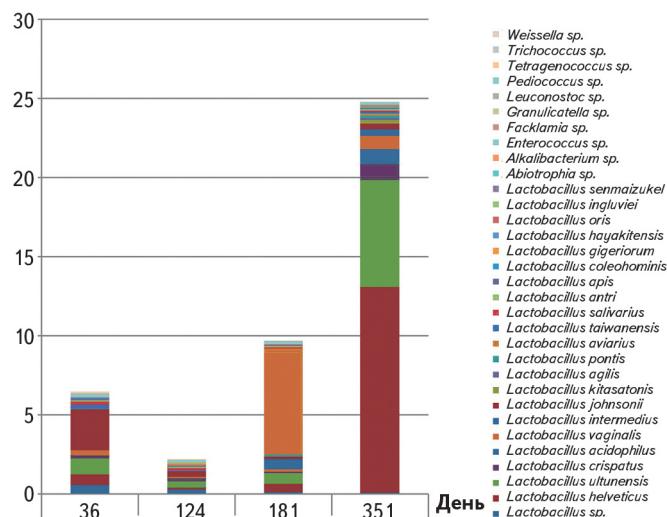


Рис. 5. Доля лактобактерий в кишечнике кур (метод NGS-секвенирования), %

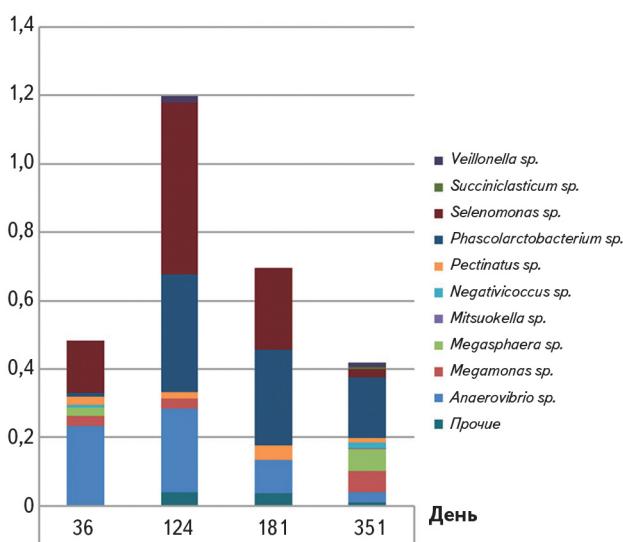


Рис. 6. Содержание ЛЖК-синтезирующих бактерий, %

Богатством родов и видов была также представлена группа ЛЖК-синтезирующих бактерий. Они играют важную роль в кишечнике, ферментируя лактат с образованием летучих жирных кислот, которые эффективно используются организмом птицы в метаболических процессах (рис. 6). Так, выявленные виды *Megasphaera hominis* и *M. paucivorans* продуцируют в кишечнике бутират, ацетат, формиат, капроат, витамины и незаменимые аминокислоты. Интересно обнаружение среди ЛЖК-синтезирующих бактерий высокого содержания важного вида *Anaerovibrio lipolyticus*. Это уникальная бактерия, обладающая редкой способностью к гидролизу липидов у животных и птицы.

В результате исследований методом NGS-секвенирование было продемонстрировано позитивное влияние на состав микробиома кишечника ввода пробиотика Профоркт в рацион птицы родительского стада.

Таким образом, нормальная микрофлора, населяющая желудочно-кишечный тракт птицы, — это дополнительный орган, выполняющий незаменимые функции по перевариванию кормов, поддержанию иммунитета, защиты от патогенов и пр. При использовании кормов низкого качества, при заболеваемости и снижении иммунитета патогенная микрофлора начинает получать конкурентное преимущество. Патогенные формы могут нарушать эпителиальный барьер кишечника, проникая в кровь и поражая органы и ткани.

Основным инструментом борьбы с патогенами должно стать оздоровление микробиома кишечника с учетом принципов саморегуляции, что открывает большую перспективу использования в птицеводстве натуральных пробиотиков.

Анализ состава микробиома кишечника птицы с использованием современных молекулярно-генетических методов позволяет своевременно выявить дисбиотические нарушения, оценить состояние здоровья макроорганизма, влияние различных компонентов рациона, эффективность действия лекарственных препаратов и кормовых добавок. Наиболее информативным инструментом для исследования микробиома кишечника по праву можно считать высокопроизводительное NGS-секвенирование.

Исследование проводилось при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации. Договор №14.W03.31.0013 от 20.02.2017, проект «Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве».



ООО «БИОТРОФ»

192288, Санкт-Петербург,
а/я 183

+7 (812) 322-85-50,
448-08-68

e-mail: biotrof@biotrof.ru
www.biotrof-plus.ru

На правах рекламы