

О ЧЕМ РАССКАЖЕТ АНАЛИЗ МИКРОБИОМА

Е. ЙЫЛДЫРЫМ, Л. ИЛЬИНА, А. ДУБРОВИН, В. ФИЛИПОВА, Н. НОВИКОВА, Д. ТЮРИНА, Г. ЛАПТЕВ, ООО «Биотроф»

В настоящее время уже многие специалисты животноводческих предприятий смогли ознакомиться с отчетами ООО «Биотроф» об изучении бактериальных сообществ. С 2008 г. собственная молекулярно-генетическая лаборатория выполняет такие исследования для покупателей продукции компании «Биотроф» и для научных организаций. В этой статье мы обобщаем часто встречаемые вопросы конечных получателей таких отчетов — ветеринарных врачей, зоотехников, руководителей птицеводческих, свиноводческих и скотоводческих хозяйств.

ЗАЧЕМ ИЗУЧАТЬ МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА

В пищеварительной системе животных и птицы присутствует множество разнообразных микроорганизмов. Учеными установлено, что в здоровом организме микрофлора представляет сложную и сбалансированную симбиотическую микроэкосистему с нормальными метаболическими свойствами. Основная функция нормофлоры — выработка ферментов (целлюлазы, протеазы и др.), необходимых для пищеварения, участия в обмене веществ, защиты организма от патогенов и токсинов, синтеза летучих жирных кислот и витаминов, формирования иммунитета и др.

Однако, кроме нормофлоры, в кишечнике животных и птицы присутствуют микроорганизмы, представляющие угрозу здоровью, их называют условно-патогенными (энтеробактерии, актиномицеты и др.) и патогенными (сальмонеллы, пастереллы и др.). Пока микрофлора кишечника и иммунитет в норме, проблем с этими группами не возникает — их содержание находится на низком уровне. Однако в случае снижения резистентности происходит нарушение микроэкологии кишечника — дисбиозы. Увеличение количества условно-патогенных форм вызывает метаболические и иммунные расстройства организма, что отражается на продуктивности и сроке хозяйственного использования.

Для полноценной диагностики и определения причин нарушений ис-



Рис. 1. В Центре молекулярно-генетических исследований НПК «Биотроф»

пользуется лабораторное исследование состава кишечной микрофлоры. В результате такого анализа все микроорганизмы разбиваются по родам и видам и устанавливаются их функции. Это важнейший шаг в диагностике заболевания, причин снижения продуктивности и других патологических состояний, выбора правильной терапии и методов профилактики.

КУДА БЕЖАТЬ, КАКОЙ АНАЛИЗ СДАВАТЬ

В желудочно-кишечном тракте животных и птицы обитают около 600–900 видов бактерий. При выполнении анализа бактерий с помощью культуральных методов можно узнать о присутствии около 20–30 видов бактерий, которые мы выбрали только потому, что они в состоянии расти в этой питательной среде. Большая часть кишечных обитателей не культивируется, то есть увидеть своими глазами их колонии в чашке Петри мы не можем.

Иными словами, делая выводы о состоянии микрофлоры по 20–30 видам, мы игнорируем подавляющее большинство бактерий.

В связи с этим на современном этапе развития науки для анализа микробного «мегаполиса» кишечника используются методы метагеномики, позволяющие за один «прогон» описать все 100% бактерий микробной экосистемы. Когда такие технологии появились, выяснилось, что от 50 до 99% видов, обнаруживаемых при генетическом анализе, вообще неизвестны науке.

Одна из наиболее сложных современных и дорогостоящих технологий, используемых для анализа метагенома, — NGS-секвенирование (next generation sequencing), которое позволяет выявить полный видовой состав всех микроорганизмов. В России NGS-секвенирование для анализа кишечного микробиома сельскохозяйственных животных и птицы применяется только в одной лаборатории — в молекулярно-

генетическом центре НПК «Биотроф» (рис. 1). Работа проводится под руководством доктора биологических наук, лауреата премии Правительства РФ Георгия Юрьевича Лаптева.

Метод NGS-секвенирования позволяет охарактеризовать состав и баланс микрофлоры кишечника, сделать выводы о его вкладе в общее состояние здоровья, уровень продуктивности, а также об эффекте, который на него оказывает тот или иной компонент рациона, кормовая добавка или лекарственное вещество как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе, чего не может предложить ни одна из компаний, занимающихся распространением пробиотиков в России.

Отчет об изучении бактериального сообщества — это материало-, капитало- и трудоемкий продукт. Работа включает в себя выделение, очистку ДНК из образцов, амплификацию генетического материала, метагеномное секвенирование на геномном секвенаторе, расшифровку и сравнение последовательностей ДНК с существующими базами данных. Данные, полученные в результате такого эксперимента, содержат огромное количество информации, поскольку они представляют собой фрагменты ДНК, принадлежащие тысячам разных бактериальных видов. Сбор и извлечение полезной биологической информации из наборов данных такого внушительного размера — сложная и длительная процедура. Все эти этапы осуществляются в НПК «Биотроф». На заключительном этапе исследователь создает отчет об анализе микробиома. Каждый такой отчет представляет собой цельное исследование и имеет высокую научную ценность, поэтому период от передачи образцов до получения результата не может быть меньше трех недель.

До 2016 г. вопросу о нормах содержания бактерий в ЖКТ сельскохозяйственных животных и птицы не уделяли внимания. На основании анализов нескольких тысяч образцов химуса кишечника бройлеров и содержимого рубца коров, проведенных в ООО «Биотроф», впервые

в мире были разработаны нормы содержания микроорганизмов в ЖКТ с учетом возраста и физиологического состояния животных и птицы.

Сегодня специалисты эффективно используют полученные знания для оценки микробиома желудочно-кишечного тракта и выбора методов коррекции дисбиотических нарушений.

КАК ЧИТАТЬ ОТЧЕТ ОБ АНАЛИЗЕ МИКРОФЛОРЫ

Анализ микробиоты, проводимый специалистами НПК «Биотроф», — тот же генетический тест, только здесь материалом для исследования является ДНК бактерий организма. Мы научились применять данную технологию в практике животноводства и птицеводства и определять «микробный статус» животных и птицы, что вносит вклад в разработку стратегий для выбора методов лечения.

Насколько же могут оказаться полезными для специалиста результаты отчета о генетическом тестировании кишечной микрофлоры?

Здоровье и продуктивность зависят от разнообразия видового состава микрофлоры. Чем больше видов бактерий, тем выше компенсаторный потенциал всей микробиоты: при исчезновении одного или нескольких видов полезных бактерий их могут начать вытеснять патогенные формы.

Как оказалось, для каждого из патологических состояний организма, будь то заболевания или падение продуктивности, свойственно особенное количественное и качественное содержание микроорганизмов в кишечнике (рис. 2), поэтому определены четкие пороговые значения для тех или иных групп микроорганизмов.

На основании того, в каком соотношении и какие именно группы микроорганизмов содержатся в кишечнике, можно заключить о балансе полезных и патогенных бактерий, сделать выводы о причинах того или иного нарушения.

Для кишечного микробиома, как и для других микроорганизмов, характерна выраженная гетерогенность

свойств внутри рода в связи с высокой изменчивостью геномов бактерий. Разные виды бактерий внутри общей таксономической группы обладают разными свойствами. Поэтому при описании состава микробиома пищеварительной системы бактерии необходимо разделять не только по физиологическим группам, семействам, родам, но и по видам. Например, внутри рода *Clostridium* встречаются как патогенные формы, так и виды, связываемые с высокой продуктивностью, в частности *C. butyricum* — известный продуцент масляной кислоты. Масляная кислота, или бутират, является основным энергетическим материалом для клеток слизистой оболочки кишечника, а также проявляет противовоспалительные свойства.

По значению доли представителей нормофлоры целлюлозолитиков можно оценить способность микробиоты расщеплять некрахмалистые полисахариды кормов, а значит, понять эффективность работы пищеварительной системы. В здоровом кишечнике суммарно эти бактерии должны доминировать, падение их содержания говорит о нарушении процессов переваривания корма. Доля бактерий рода *Bacillus*



Рис. 2. Содержание бактерий в кишечнике бройлеров

указывает на уровень способности синтезировать антимикробные вещества, следовательно, и на уровень защищенности организма от заболеваний. Кроме того, с успехом можно оценить потенциал микробиоты к синтезу витаминов, короткоцепочечных жирных кислот, в том числе высокоценного бутирата. Не все витамины могут синтезироваться в организме животных и птицы, поэтому витаминизирующий потенциал микроорганизмов — тоже важный показатель (некоторые витамины синтезируются микроорганизмами, обитающими в кишечнике).

На основании исследования микробиоты кишечника были выделены характерные для различных заболеваний профили видового состава патогенных бактерий (рис. 3). Получая картину присутствия патогенных форм, можно спрогнозировать риск развития заболеваний и проблем с продуктивностью, а также получить рекомендации по профилактике.

ПОЧЕМУ БАКТЕРИИ ВЫШЛИ ИЗ-ПОД КОНТРОЛЯ

Что же вызывает дисбиоз кишечной микрофлоры?

Как и любая сложная система, организм животных и птицы подвержен влиянию множества факторов, как внешних, так и внутренних, многие из которых могут негативно влиять на микрофлору, провоцировать нарушения здоровья и падение продуктивности.

Интересно, что в последние годы качество питьевой воды как источника заражения патогенами привлекает много внимания специалистов и консультантов, причем это касается не только животных и птицы, но и человека. Тем не менее образцы воды, отобранные специалистами НПК «Биотроф» на птицефабриках, а также смывы с поилок оказались низко обсемененными бактериальной флорой (не более 10^3 КОЕ/мл).

Основными же резервуарами возбудителей инфекций оказались корма, присутствие патогенов в которых

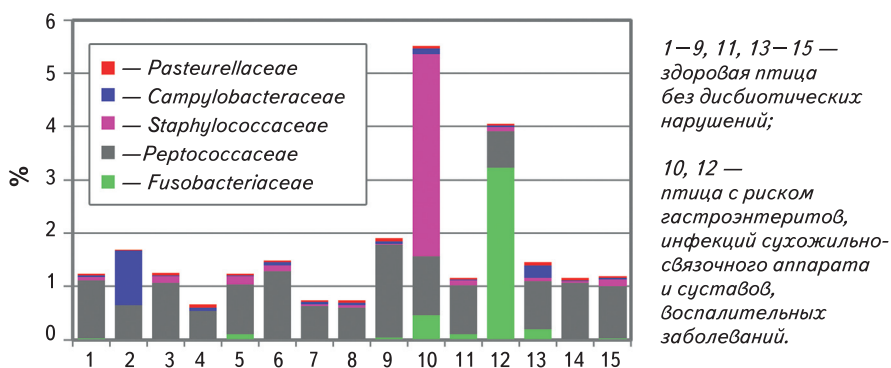


Рис. 3. Содержание патогенов в кишечнике кур-несушек

является одной из наиболее распространенных причин дисбаланса микрофлоры желудочно-кишечного тракта птицы.

При обобщении результатов 14 анализов, проведенных на нескольких ведущих птицефабриках, оказалось, что среди патогенных и потенциально патогенных бактерий, взаимодействующих с кормами, встречаются сальмонеллы, иерсинии, *Enterococcus*

cesorum и ряд других опасных возбудителей заболеваний (табл. 1). Большинство кормов было контаминировано одновременно несколькими патогенами. Например, *Escherichia sp.* и *Staphylococcus sp.* обнаруживались во всех исследованных пробах.

Важно понимать, что внешний вид пораженного патогенами комбикорма не отличается от условно «чистого» комбикорма. Возникает вопрос,

Таблица 1. Результаты мониторинга содержания патогенов в кормах методом NGS-секвенирования

Патоген	Заболевание	Содержание, среднее — максимальное, клеток/г корма	Встречаемость в пробах, %
<i>Enterococcus cecorum</i>	Заболевания опорно-двигательного аппарата, энтериты	$1,8 \times 10^4$ — $3,4 \times 10^4$	23
<i>Klebsiella sp.</i>	Клебсиеллез с разнообразной симптоматикой, трансвариальное заражение эмбрионов с последующим замиранием развития	$1,4 \times 10^4$ — $3,3 \times 10^4$	31
<i>Pasteurellaceae</i>	Пастереллез (геморрагическая септицемия)	$3,5 \times 10^4$ — $4,4 \times 10^4$	62
<i>Yersinia sp.</i>	Кишечный иерсиниоз	$6,4 \times 10^4$ — $1,9 \times 10^5$	85
<i>Legionella sp.</i>	Болезни органов дыхания	$6,2 \times 10^3$ — $4,5 \times 10^4$	46
<i>Escherichia sp.</i>	Гастрозентериты	$3,4 \times 10^5$ — $7,7 \times 10^5$	100
<i>Staphylococcus sp.</i>	Инфекции трубчатых костей, сухожильно-связочного аппарата и суставов	$2,8 \times 10^5$ — $1,2 \times 10^6$	100
<i>Streptococcus sp.</i>	Септицемии	$7,9 \times 10^4$ — $1,3 \times 10^5$	77
<i>Campylobacter sp.</i>	Кампилобактериоз — острая кишечная инфекция, опасная в большей степени для человека	$2,3 \times 10^3$ — $1,9 \times 10^4$	15
<i>Salmonella enterica</i>	Сальмонеллез (чаще в виде септицемии и диареи)	$3,4 \times 10^4$ — $6,1 \times 10^4$	31
<i>Mycoplasma sp.</i>	Микоплазмоз — поражение органов дыхания	$1,9 \times 10^4$ — $9,4 \times 10^4$	62
<i>Erysipelothrix sp.</i>	Рожистое воспаление у людей	$5,3 \times 10^2$ — $5,8 \times 10^3$	8

каким же образом патогены проникли в корм? Дело в том, что корм для птицы преимущественно растительного происхождения, а растения — это естественная среда обитания не только эпифитных и эндофитных микроорганизмов, но нередко и возбудителей так называемых сапронозных инфекций, для которых главным естественным местом обитания являются абиотические (неживые) объекты окружающей среды.

О присутствии патогенов в кормах для животных и птицы известно давно. Еще в 1986 г. Г.В. Ющенко установила значительную роль грызунов в инфицировании возбудителем иерсиниоза объектов агрокомплекса, включая корма и подстилку. Тем не менее список возбудителей заболеваний постоянно пополняется представителями некультивируемых микроорганизмов, о существовании которых стало известно только в связи с развитием молекулярно-биологических методов изучения микрофлоры.

Почему же термическая обработка корма при гранулировании ненадежное средство против патогенов?

Причина сохранности патогенов при нагревании, по нашему мнению, заключается в их особой эволюционно сформированной стратегии выживания. Во-первых, многие из них имеют меж- и внутриклеточную локализацию в компонентах растительного происхождения. Быстрая адаптация к агрессивным условиям окружающей среды позволяет в нужный момент переходить в покоящееся, или некультивируемое, состояние (Литвин и др., 1998). Большинство патогенов обладает способностью формировать биопленки благодаря «оснащенности» жгутиками, пиями и возможностью синтезировать особые защитные вещества — экзополисахариды. Не исключено, что воздействие агрессивных факторов (температура и низкая влажность) может создать эффект стимуляции запуска механизмов выживаемости, которые в дальнейшем приводят к резкому увеличению концентрации патогенов при попадании в организм.

Возбудителей заболеваний, присутствующих в кормах, не следует недооценивать. Многие из них характеризуются полигостальностью — широким кругом потенциальных хозяев, они могут стать общими как для птицы, так и для потребителя продукции птицеводства — человека.

В связи с этим информация о микрофлоре помещений, подстилки, кормов также является важным ресурсом продуктивности.

ИЗ КОРМОВ В КИШЕЧНИК

Как уже стало понятно, в птицеводстве серьезно недооценивается инфекционный потенциал кормов. Именно из-за высокой их обсемененности патогенные формы будут всегда присутствовать в здоровом организме, вызывая инфицирование при снижении резистентности. На рисунке 4 представлены данные встречаемости патогенов в содержимом кишечника клинически здоровых бройлеров и несушек, полученные методом NGS-секвенирования. Сведения были собраны на основе многолетних мониторинговых исследований на ведущих яичных и бройлерных птицефабриках. Для сравнения приведены результаты представленности патогенных форм в кормах, которые наглядно подтверждают их циркуляцию по звеньям технологической цепи.

Интересно, что среднее содержание (доля среди других представителей микробиоты) патогенов в кишечнике

кур значительно варьировало в зависимости от применения пробиотиков (табл. 2). При использовании биопрепаратов производства НПК «Биотроф» снижалось количество возбудителей гастроэнтеритов, случаев заболеваний респираторной системы, опорно-двигательного аппарата, септицемий до 980 раз. Важным результатом являлось то, что применение пробиотиков полностью сдерживало развитие пастерелл как у бройлеров, так и у несушек. На бройлерных птицефабриках удалось остановить рост в кишечнике птицы бактерий *Enterococcus cecorum*.

Роль пробиотических добавок, которые разрабатывает НПК «Биотроф», заключается в механизмах восстановления естественной резистентности нормобиоты. На «первом рубеже» пробиотики конкурируют с патогенами за рецепторы слизистой оболочки кишечника, другим этапом их работы является синтез антимикробных веществ — карбоновых кислот и бактериоцинов.

Яркий пример — многокомпонентный **пробиотик Профорт** на основе двух штаммов микроорганизмов *Bacillus sp.* и *Enterococcus sp.* Для детального изучения всех свойств штаммов бактерий, входящих в состав Профорта, был применен инновационный метод полногеномного секвенирования, который позволил оценить функцию каждого гена в составе генома и описать все механизмы

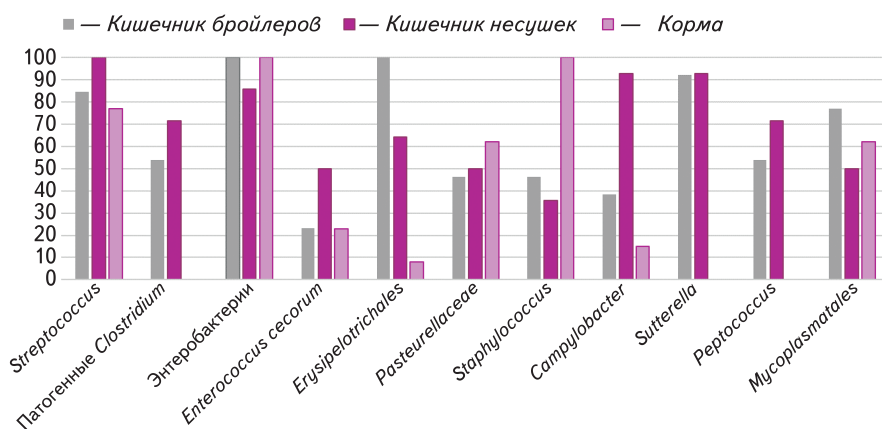


Рис. 4. Частота встречаемости патогенов в кишечнике клинически здоровой птицы и в кормах, %

действия и биологический потенциал на молекулярном уровне. Проведенный филогенетический анализ выявил уникальность метаболических возможностей данных микроорганизмов по сравнению с аналогичными видами бактерий. В составе генома *Bacillus sp.* локализованы гены, связанные с продукцией белков (FabD, FabF, FabG, FabZ, FabI и др.), которые участвуют в синтезе 9 карбоновых кислот с антимикробными свойствами, в частности масляной (бутирата), капроновой, каприловой и др. Обнаружен целый кластер генов (Asm22–24, Asm43–45, Asm47), связанных с биосинтезом бактериоцинов — безопасных антибиотиков естественного происхождения.

Таким образом, сведения о природе микробиома кишечника, на-

Таблица 2. Средняя доля патогенов среди других представителей микробиоты в кишечнике птицы, %

Патоген	Бройлеры		Несушки	
	Без пробиотиков	Пробиотики НПК «Биотроф»	Без пробиотиков	Пробиотики НПК «Биотроф»
<i>Streptococcus sp.</i>	0,54	0,05 (↓ в 10,8 раз)	0,35	0,09 (↓ в 3,9 раз)
Патогенные <i>Clostridium sp.</i>	0,13	0,06 (↓ в 2,2 раза)	0,19	0,08 (↓ в 2,4 раза)
<i>Peptococcus sp.</i>	0,04	0,02 (↓ в 2 раза)	1,07	0,09 (↓ в 11,9 раз)
<i>Helicobacter sp.</i>	0,01	0,05	0,06	0,05 (↓ в 1,2 раза)
<i>Sutterella sp.</i>	0,98	0,001 (↓ в 980 раз)	0,27	0,05 (↓ в 5,4 раза)
Энтеробактерии	8,7	1,3 (↓ в 6,7 раз)	0,2	0,1 (↓ в 2 раза)
<i>Enterococcus cecorum</i>	0,01	Отсутствовали	0,07	0,06 (↓ в 1,2 раза)
<i>Erysipelotrichales</i>	0,49	0,07 (↓ в 7 раз)	0,17	0,19
<i>Pasteurellaceae</i>	0,01	Отсутствовали	0,006	Отсутствовали
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,02	0,01 (↓ в 2 раза)	0,003	0,01
<i>Campylobacter sp.</i>	0,004	Отсутствовали	0,22	0,04 (↓ в 5,5 раз)
<i>Mycoplasmatales</i>	0,04	0,008 (↓ в 5 раз)	0,01	0,003 (↓ в 3,3 раза)
<i>Rickettsia sp.</i>	0,01	Отсутствовали	0,005	Отсутствовали

копленные к настоящему времени, достаточны для четкого понимания важной его роли как дополнительного многофункционального органа животных и птицы. Знание о составе микробиома пищеварительной системы содержит информацию о состоянии метаболизма, уровне резистентности, заболеваемости. Однако для реализации возможностей в управлении микробиомом при патологиях, связанных с дисбактериозом, необходим количественный метод определения изменений в составе до-

статочно широкого круга ключевых микроорганизмов и их мониторинга в процессе коррекции. Поэтому на современном этапе развития науки для анализа микробного «мегаполиса» кишечника используются методы метагеномики, позволяющие за один «прогон» описать все 100% бактерий микробной экосистемы. Нужно принимать во внимание и необходимость вести наблюдение за циркуляцией патогенных форм на птицефабриках для выработки комплексных методов и тактики борьбы с ними. ■



ООО «БИОТРОФ»

192288, Санкт-Петербург, а/я 183

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

e-mail: biotrof@biotrof.ru

www.biotrof.ru

На правах рекламы



ИНФОРМАЦИЯ

Кормовая отрасль переходит на онлайн-аудиты. Цифровые сервисы в сфере аудита кормовой отрасли стали намного популярнее в период коронавирусной пандемии, отмечают представители GMP+ International. Вместе с тем основная проблема заключается в том, что сертификат (подтверждающий соответствие всем требованиям стандарта GMP+) должен быть выдан на основе объективной информации, однако, не будучи на самом производстве, аудиторы не могут проверить ее достоверность. В настоящее время они сдают экзамены онлайн, и в ближайшем будущем будут разработаны стандарты, которые позволят сделать онлайн-аудиты предприятий массовыми, убеждены представители GMP+ International.

allaboutfeed.net/Compound-Feed/Articles/2020/

В Великобритании набирает силу кампания против легализации ГМО. Ряд правозащитных организаций обратился к властям страны с требованием отвергнуть законопроект, который может легализовать некоторые технологии изменения генома, что в свою очередь обещает вернуть на рынок ГМО-продукцию, находящуюся сегодня под запретом.

По мнению авторов технологий, проведенные исследования подтвердили безопасность технологий, которые предлагается разрешить. Отмечается, что законопроект может удешевить себестоимость производства зерна на территории Великобритании, повысить урожайность и помочь целому ряду сельскохозяйственных компаний улучшить свое положение.

feednavigator.com/Article/2020/07/28/UK-