

РОЛЬ ПРОБИОТИКОВ В УЛУЧШЕНИИ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ

Д. МЕРРИФИЛД, Плимутский университет, Великобритания

МИКРОБИОМ РЫБ

Микробиом — это совокупность всей микрофлоры, обитающей в определенной среде (в организме хозяина), и ее полный геном. Усовершенствование различных техник секвенирования и других биоинформационных технологий в последние десятилетия сделало возможным изучение микробиома человека, а также многих видов животных. Эти исследования показали, что микробиом обменивается генетической информацией с организмом хозяина, вступает во взаимодействие с его слизистыми оболочками и за счет этого играет ключевую роль в регуляции роста и развития, пищеварения, гомеостаза, метаболизма, поведения и здоровья организма хозяина. Несмотря на обилие исследований в этой области (обзоры исследований можно найти в работах Llewellyn и соавт., 2014; Romero и соавт., 2014), наши знания о микробиоме рыб пока еще очень малы по сравнению со знаниями о микробиоме человека и наземных животных, которые все более четко говорят о том, что микробиом принимает активное участие в процессах, связанных с питанием и здоровьем организма (Thavagnanam и соавт., 2008; Cani и Delzenne, 2009).

Немногочисленные исследования микробиома рыб показали, что он включает в себя сложные и разнообразные сообщества бактерий и в меньшей степени дрожжей и архей. Эти сообщества обитают на коже, жабрах и в пищеварительном тракте и влияют на разные функции организма рыб, включая пищеварение, рост, развитие, питание, иммунитет, сопротивляемость болезням. Например, у мальков данео-рерио, выращенных в микробиологически стерильных условиях, без взаимодействия с микроорганизмами, наблюдается дегенеративный фенотип (Bates и соавт., 2006; Rawls и соавт., 2007). В их пищеварительном тракте нарушены процессы дифференциации, что привело к возникновению следующих кишечных симптомов: уменьшение количества энтероэндокринных, в частности, бокаловидных клеток; снижение активности щелочной фосфатазы на кишечной каемке; сокращение кругооборота эпителиальных клеток; замедление развития экспрессии гликанов в энтероцитах; ухудшение целостности эпидермиса (Rawls и соавт., 2004; Bates и соавт., 2006).

Все эти изменения, в конечном счете, приводят к неспособности рыб усваивать протеиновые макромолекулы. Кроме того, обнаружено, что 212 генов в пищеварительном тракте регулируются микробными сообществами. Эти гены участвуют в ряде процессов, включая питание (например,

гены, участвующие в метаболизме липидов *Cpt 1a*, *Cpt 1b* и *Fbp 1*), деление клеток и репликацию ДНК (например, гены, поддерживающие минихромосомы), иммунную функцию (например, гены *Saa 1*, *Crp*, *C3* и *Socs3*) (Rawls и соавт., 2004). Условно-патогенные и благотворные компоненты микробиома также важны, они выполняют барьерную функцию (предотвращают попадание в организм хозяина патогенов из внешней среды) за счет конкуренции с патогенами за «сайты» адгезии и питательные вещества, а также за счет выделения различных веществ, обладающих антимикробной активностью.

Помимо важных функций, способствующих развитию организма и его иммунитета, микробиом пищеварительного тракта также играет важную роль в питании, синтезируя и выделяя витамины, внеклеточные пищеварительные ферменты и короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК). Например, КЦЖК, образующиеся как конечный продукт ферментации кормовой клетчатки микрофлорой кишечника, могут использоваться прямо на месте образования как источник энергии в энтероцитах или проходить через стенки кишечника и всасываться в кровоток (Clements, 1991; Clements и Choat, 1995; Mountfort и соавт., 2002). У млекопитающих микробные КЦЖК играют важную роль в обеспечении организма энергией, поэтому логично предположить, что они выполняют ту же функцию и у рыб. Однако, несмотря на положительные стороны, микробиом включает и патогены, которые могут заражать организмы других особей с ослабленным иммунитетом. Также микробиом может содержать и первичные патогены, активность которых в норме подавляется антагонистическим действием условно-патогенных и благотворных компонентов микробиома, собственной иммунной системой хозяина.

Почти все опубликованные данные по микробиому рыб получены в исследованиях с выращиванием культур. Хотя такие исследования могут давать полезную информацию, у некоторых видов рыб они охватывают менее 1% всего микробиома их организма (Navarrete и соавт., 2009). В результате в последнее десятилетие для исследования микробиома рыб все шире используются молекулярно-генетические методы, такие как «отпечатки пальцев» (фингерпринтинг) бактериального сообщества, например, с помощью метода DGGE — гелевого электрофореза по градиенту денатурации. Однако эти подходы пока являются скорее качественными, чем количественными, и часто не позволяют обнаружить малочисленные индивидуальные популяции в составе

микробных сообществ. В исследованиях последних лет с использованием самых современных техник секвенирования созданы генные библиотеки 16S рНК, которые расширили знания о «биосфере» кишечника рыб, а также дали чрезвычайно интересную информацию о влиянии рационов на некоторые аспекты жизнедеятельности их микробиома (Standen и соавт., 2015; Falcinelli и соавт., 2015, 2016; Apper и соавт., 2016).

ПРОБИОТИКИ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Поскольку рыбы и другие объекты аквакультуры живут в водной среде с высокой бактериальной нагрузкой, определение понятия «пробиотик» для аквакультуры в свое время вызвало научные споры (Merrifield и соавт., 2010). Целевым местом применения пробиотиков является сама вода, которую могут колонизировать благотворные бактерии, изменяя таким образом состав микробного сообщества. Вода может служить вектором для доставки благотворных бактерий в организм хозяев — рыб. Поэтому понятие «пробиотик», первоначально предложенное для наземных животных, пришлось несколько пересмотреть применительно к аквакультуре, как и других подобных терминов, таких как средства биоконтроля или биоремедиации. Значения всех этих терминов отчасти перекрывают друг друга, поэтому, например, понятие «пробиотик» используют в таком значении: «любой живой микробный препарат, который вводится в корма или в воду с целью улучшения микробного баланса самого организма или среды его обитания».

Исследования по применению пробиотических микроорганизмов в аквакультуре начались около 30 лет назад. Основная причина — потребность в альтернативных профилактических методах для повышения выживаемости рыбы на разных стадиях ее интенсивного выращивания. Постепенно пробиотики и другие модификаторы микрофлоры получили широкое распространение в практической аквакультуре. Их применение дает ряд положительных эффектов: модулирует иммунную систему организма рыб, повышает выживаемость, эффективность использования кормов и сопротивляемость болезням.

ПРОБИОТИКИ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ КИШЕЧНИКА РЫБ

На прикрепление к поверхности слизистых оболочек хозяина пробиотических, патогенных или условно-патогенных микроорганизмов значительное влияние оказывают состав и свойства слизи. Информационный обмен между микробами и хозяином на уровне слизистых — это сложный процесс, который определяет природу взаимо-

действия между ними. Для млекопитающих механизмы этих процессов довольно хорошо описаны; выделен также ряд ключевых информационных молекул. Хотя для рыб таких данных немного (за исключением результатов исследований с конкретными пробиотиками и патогенами), но у них были обнаружены те же или аналогичные процессы информационного обмена и соответствующие сигнальные молекулы (см. обзоры Foeу и Picchietti, 2014; Salinas и Parra, 2015).

Распознавание микробов на слизистой кишечника (как и на других слизистых оболочках) происходит с помощью рецепторов распознавания паттернов (PRR), из которых наиболее изучены толл-подобные рецепторы (TLR). В ряде исследований на рыбах было показано, что бактериальные пробиотики могут усиливать экспрессию генов TLR (например, TLR-2) в кишечнике. После активации TLR запускается сложный каскад реакций с участием адаптерных молекул (например, белка Myd-88) и фактора транскрипции NFκB, синтезирующего провоспалительные цитокины (например, интерлейкины IL-1β и IL-8, фактор некроза опухолей TNFα). В ряде исследований показано, что при скармливании рыбам пробиотиков происходит изменение экспрессии некоторых компонентов этого метаболического пути. Данный провоспалительный ответ также характеризовался повышением рекрутирования лейкоцитов в кишечный эпителий, усилением образования бокаловидных клеток и ростом экспрессии генов, связанных с муцином и с иммунитетом (Carnevali и соавт., 2014; Lauzon и соавт., 2014). Однако у костистых рыб выработался набор механизмов

для предотвращения возникновения избыточного воспалительного ответа на условно-патогенные и симбиотические микроорганизмы. Эти процессы стали изучать и описывать сравнительно недавно. Известные на данный момент защитные механизмы включают биосинтез интегрин-ассоциированного протеина (IAP), противовоспалительных цитокинов (TGF-β и IL-10) и ряда регуляторных молекул (белки DIGIRR и TOLLIP).

Вместе с усилением провоспалительного кишечного ответа на скармливание рыбам пробиотиков в этих же работах также отмечено повышение экспрессии противовоспалительных генов (например, гена IL-10), что может свидетельствовать об улучшении кишечного иммунитета без избыточного воспалительного ответа. Эта гипотеза подтверждается гистологическими исследованиями, доказавшими, что скармливание рыбам пробиотиков не приводит к появлению кишечных патологий или изъязвлений, а в некоторых случаях могут наблюдаться по-



ложительные морфологические изменения в кишечнике, включая увеличение длины циркулярных складок, высоты и плотности ворсинок, что в сочетании приводит к росту удельной всасывающей поверхности (Carnevali и соавт., 2014; Lauzon и соавт., 2014). Однако доступная литература по результатам исследований неоднородна: по каждому приведенному положительному действию пробиотиков, как локальному (на уровне кишечника), так и системному, можно найти несколько публикаций, в которых положительных эффектов не обнаружено. Во многих случаях это связано с использованием в исследованиях новых (или неэффективных) пробиотических штаммов, с неверно подобранной дозировкой или с неудачным выбором вектора для доставки пробиотика. Однако даже если в разных исследованиях использовались те же штаммы пробиотика и вид рыб, результаты все равно часто бывают противоречивыми. Это обусловлено уникальной особенностью применения пробиотиков в аквакультуре, чего не наблюдается при использовании их для человека, наземных животных или птицы.

НАПРАВЛЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рыбы являются пойкилотермическими организмами (не поддерживают постоянной температуры тела), поэтому интенсивность их метаболизма, как и метаболизма их микробиома (включая внедренный в него пробиотик), сильно зависит от условий окружающей среды. Хотя в литературе достаточно свидетельств того, что у большинства видов рыб основной состав микробиома пищеварительного тракта примерно постоянный для данного вида (Roeselers и соавт., 2011; Romero и соавт., 2014; Falcinelli и соавт., 2015, 2016), также есть данные о том, что у рыб одного вида, выращенных в разных условиях, в разные сезоны года, на разных рационах, а также на разных стадиях онтогенеза, могут вырабатываться различные фенотипы микробиома (Romero и соавт., 2014; Merrifield и Rodiles, 2015). Поэтому эффективность использования пробиотиков у аквакультурных видов в значительной мере будет зависеть от конкретных условий выращивания и от складывающихся при

этом фенотипов микробиома. Это осложняет разработку и оптимизацию программ применения пробиотиков при выращивании рыб и других водных объектов.

Будущие исследования по использованию пробиотиков в рыбоводстве, на наш взгляд, должны охватывать три основных направления.

Во-первых, необходимо расширить знания о микробиоме рыб для каждого значимого аквакультурного вида: как изменяется состав, плотность и биоразнообразие микробиома у данного вида в онтогенезе; как связаны генотипы рыб-хозяев с генотипами микробиомов; как фенотип рыб (доминантный или рецессивный, быстро или медленно растущий, устойчивый к определенной болезни или нет) влияет на состав микробиома.

Во-вторых, необходимо более глубоко изучить функционирование микробиома, например, знать не только какие микроорганизмы присутствуют в кишечнике, но и какие функции они выполняют. Учитывая постепенное снижение стоимости секвенирования, можно ожидать, что в ближайшее десятилетие базы данных о микробиомах рыб существенно расширятся благодаря методам метагеномики и метатранскриптомики.

В-третьих, мы должны лучше узнать локальные ответы организма рыбы-хозяина на его микробиом, а также изменения этих ответов при изменении микробиома, естественном или искусственно индуцированном, например, с помощью пробиотика. Это новый аспект, при изучении которого используют транскриптомный анализ образцов из кишечника рыб, получавших пробиотики. Дальнейших исследований и совершенствования требует протеомный анализ кишечной слизи рыб, получавших пробиотики.

Обладая такой информацией, можно принимать более взвешенные и научно обоснованные решения о том, какие пробиотики подходят конкретным видам рыб, когда и как их следует применять. ■

*Источник: World Nutrition Forum 2016, Biomin, Ванкувер (Канада)
Перевод: А. Толкачёв*



ИНФОРМАЦИЯ

Около 3 т виноградных улиток из белорусского фермерского хозяйства «Ратов» Гродненской области осенью могут отправиться в страны СНГ и Евросоюза. Об этом сообщает *belta.by* со ссылкой на руководителя хозяйства Владимира Рабкова. «Мы единственные, кто начал растить улиток из мальков, причем из тех, что были получены в дикой природе. Маточное

стадо собрали здесь — в окрестностях Долгиново», — рассказал предприниматель. Кстати, тот вид виноградных улиток, что проживает в Беларуси, особенно ценится во Франции и Бельгии. Гродненские погодные условия отлично подходят для выращивания улиток, лишь на зиму им необходимо тепломещение. Впрочем, стоит учитывать немало и других нюансов, в том числе

по поддержанию режимов влажности, температуры, питания. Для своих подопечных на ферме разработали специальный состав корма: сбалансированное содержание в нем различных элементов необходимо для правильного развития моллюска и панциря. Такой подход дает свой результат — фермерские улитки вырастают более крупными, чем в дикой природе.