

УДК 001.89:636.5:636.085

МЕТАГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА ПТИЦЫ — ОСНОВА ВЫБОРА КОРМОВЫХ ДОБАВОК*

Фисинин В.И., директор, академик РАН, д-р с.-х. наук

Егоров И.А., заместитель директора по НИР, академик РАН, д-р биол. наук

Манукян В.А., заведующий отделом кормления, д-р с.-х. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФГБНУ ВНИТИП)

Лаптев Г.Ю., директор, д-р биол. наук

Никонов И.Н., главный специалист по координации НИОКР

Ильина Л.А., начальник молекулярно-генетической лаборатории, канд. биол. наук

Новикова Н.И., заместитель директора, канд. биол. наук

ООО «БИОТРОФ+», г. Санкт-Петербург

Аннотация: Основа нового анализа — комплекс методических подходов на базе T-RFLP-анализа и ПЦР в реальном времени. Применение комплекса молекулярно-генетических методов позволяет быстро и точно оценить действие той или иной кормовой добавки на состав и структуру микробиоценозов кишечника.

Summary: Methodic approaches complex at the base of T-RFLP-analysis and PCR in real time is the base of new analysis. Molecular-and-genetic methods complex usage gives the possibility to estimate quickly and accurately different feed additives action on intestines microbiocenosis composition and structure.

Ключевые слова: микрофлора кишечника, T-RFLP-анализ, ПЦР в реальном времени, пробиотики, пребиотики, фитобиотики, подкислители.

Key Words: intestines microflora, T-RFLP-analysis, PCR in real time, probiotics, prebiotics, phitobiotics, acidifiers.

Рентабельность производства продукции птицеводства и конкурентоспособность на рынке — основа развития птицеводческой отрасли. Современное птицеводство отличается высокой индустриализацией, включающей большие масштабы, использование закрытых помещений с регулируемым микроклиматом и автоматизацией технологических процессов. Основные затраты (70–80%) современной птицефабрики составляют затраты на корма.

Благодаря успехам генетики и селекции скорость метаболических процессов у современных кроссов становится все выше, и лимитирующим фактором развития отрасли оказывается способность пищеварительной системы птицы с максимальной скоростью вовлекать питательные вещества комбикорма в биосинтетические процессы, происходящие в организме. В связи с этим биологические особенности сель-

скохозяйственной птицы, как конвертора растительных полимеров, требуют функциональной поддержки пищеварительной системы, особенно — коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы, в первую очередь резидентная и симбиотическая, влияет на здоровье птицы (в том числе на иммунитет), на продуктивность (конверсию компонентов корма, особенно — растительных полимеров) и соответственно на срок продуктивного использования. От состояния микрофлоры кишечника кур зависит и санитарно-гигиеническое состояние продукции птицеводства (мяса, яиц). Так, за счет контаминации мяса и яиц бактериями, являющимися нормальными обитателями кишечника кур, у людей могут возникать пищевые токсикоинфекции, например кампилобактериозы [1].

Для нормализации и восстановления микрофлоры кишечника в настоящее время используют различные кормовые добавки, положительно воздействующие на микробное сообщество желудочно-кишечного тракта кур. Примерами кормовых добавок могут служить кормовые антибиотики, пробиотики, пребиотики, подкислители, фитобиотики. Отмечено опосредованное влияние кормовых ферментов на микрофлору желудочно-кишечного тракта. Сравнительные характеристики кормовых добавок приведены в *таблице*, из которой видно, что механизм действия кормовых добавок, влияющих на микрофлору кишечника, заключается в подавлении роста и развития патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Существенным недостатком большинства кормовых добавок является их неспособность к расщеплению некрахмалистых полисахаридов и других компонентов

*Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда по научному проекту №14-16-00140 «Современные представления о микрофлоре кишечника птицы при различных рационах питания: молекулярно-генетические подходы».

Таблица

Сравнительные характеристики кормовых добавок, влияющих на микрофлору кишечника

Кормовые добавки	Механизм действия	Недостатки
Кормовые антибиотики	Уничтожение части кишечных микроорганизмов — перераспределение питательных веществ в пользу организма-хозяина, снижение риска заболеваний	Уничтожение полезной микрофлоры. Негативные эколого-санитарные эффекты. Негативное влияние на качество продукции. Неспособность разрушать некрахмалистые полисахариды
Пробиотики	Адсорбция на кишечном эпителии, синтез органических кислот — вытеснение патогенной микрофлоры	Подавляющее большинство препаратов неспособны разрушать некрахмалистые полисахариды
Пребиотики	Создание благоприятных условий для действия пробиотиков. Связывание патогенов и выведение их из пищеварительного тракта	Неспособность разрушать некрахмалистые полисахариды. Необходимость в совместном применении с пробиотиками при дисбактериозах
Подкислители	Влияние на pH корма и pH среды кишечника, подавление патогенов	Негативные экологосанитарные эффекты. Неспособность разрушать некрахмалистые полисахариды
Фитобиотики	Уничтожение части кишечных микроорганизмов — перераспределение питательных веществ в пользу организма-хозяина, снижение риска заболеваний	Неспособность разрушать некрахмалистые полисахариды

комбикорма, содержащих клетчатку. Для расщепления некрахмалистых полисахаридов используются комплексные добавки — ферментативные пробиотики.

Необходимо отметить, что оптимальный вариант использования кормовых добавок продиктован рынком. Получение максимальной продуктивности от птицы выгодно до тех пор, пока дополнительные затраты на корма не превышают дополнительную прибыль от реализации продукции. В связи с этим при подборе кормовых добавок для нормализации микрофлоры кишечника птицы нужно учитывать не только их сочетаемость, наличие эффекта синергизма, технологию ввода, но и стоимость конечного набора кормовых добавок, экономическую эффективность от их использования.

Включение в рационы питания одновременно нескольких кормовых добавок (пребиотики, пробиотики, фитобиотики, ферменты) не всегда экономически оправданно, поскольку суммарная стоимость добавок может превысить дополнительную прибыль, получаемую в результате их применения.

Огромный выбор кормовых добавок отечественного и зарубежного производства, влияющих на микрофлору кишечника кур, ставит птицевода перед существенной проблемой рационального выбора наиболее эффективных препаратов для конкрет-

ных вариантов кормления птицы. Данную проблему можно решить только с помощью максимально точного и быстрого метода анализа микрофлоры кишечника сельскохозяйственной птицы.

Метагеномный подход к анализу микрофлоры основан на применении молекулярно-генетических методов — метода полимеразной цепной реакции, секвенирования, T-RFLP [2]. Наиболее эффективным подходом к решению задачи по определению микрофлоры кишечника кур является использование метода T-RFLP-анализа. Метод основан на выделении ДНК, амплификации, секвенировании, идентификации видов микроорганизмов по международным базам данных с помощью специальных программ (например, *Fragment Sorter*) с последующим комплексным анализом полученных результатов на основе статистических (корреляционного и кластерного), таксономического и экологического подходов. T-RFLP-анализ позволяет сделать заключение о видовом составе микрофлоры, структуре микробного сообщества кишечника кур, а также выявить микроколичества патогенных и условно-патогенных видов, недоступные для определения классическими микробиологическими методами (например, посевами на питательных средах). T-RFLP-анализ позволяет не только выявить до 100% видов микроорганизмов, обитающих в кишечни-

ке, но и проследить за изменениями микрофлоры в зависимости от действующих на нее факторов, например кормовых добавок, регулирующих микрофлору.

Метод ПЦР в реальном времени используется для анализа количественного содержания конкретного микроорганизма, группы микроорганизмов или общего числа всех бактерий в пробах. Принцип метода ПЦР в реальном времени основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжиге праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров термостабильной ДНК-полимеразой.

Тест-система ПЦР в реальном времени основана на использовании специфичных генов микроорганизмов праймеров и красителя.

Использование комплекса молекулярно-генетических методов, включающего в себя ПЦР в реальном времени и T-RFLP-анализ, позволяет быстро и точно определить количественный состав и структуру микробных сообществ желудочно-кишечного тракта птицы, оценить эффективность кормовых добавок, предназначенных для коррекции микробиоценозов кишечника на основе определения изменений в различных группах

микроорганизмов (полезных молочнокислых бактерий, патогенов, целлюлозолитических бактерий и др.).

В настоящее время ВНИТИП совместно с ООО «БИОТРОФ+» выполняют исследования, направленные на определение действия рационов различного состава и питательности на микрофлору кишечника бройлеров и кур-несушек. В результате проведенной работы было установлено, что плотность бактерий в кишечнике птицы составляет 10^7 – 10^{11} клеток/г. Микробиоценозы различных отделов кишечника представлены сотнями видов бактерий, относящихся к различным таксономическим группам. Значительная часть (30–60%) видов бактерий

по количеству и структуре представлена некультивируемыми микроорганизмами, выявляемыми только с применением молекулярно-генетических методов анализа.

В заключение необходимо отметить, что метагеномные исследования кишечника кур позволяют эффективно оценить влияние различных компонентов рационов птицы на микрофлору кишечника, выявить взаимосвязи между численностью и видовым составом микроорганизмов, а также с показателями продуктивности. С помощью комплекса молекулярно-генетических методов можно осуществить рациональный выбор кормовых добавок, регулирующих микрофлору кишечника кур.

Литература

1. Torok V. A., Ophel-Keller K., Loo M. and Hughes R. J. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism // Appl Environ Microbiol. — 2008. — V. 74(3). — P. 783–791.
2. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная биология. — М.: Изд-во Московского университета, 2012. — 480 с. □

Для контактов с авторами:
Фисинин Владимир Иванович

e-mail: vnitip@vnitip

Лаптев Георгий Юрьевич

Егоров Иван Афанасьевич

Манукян Вардгес Агавардович

Никонов Илья Николаевич

e-mail: nikonov@biotrof.ru

Ильина Лариса Александровна

Новикова Наталья Ивановна

Международный Центр Стандартизации и Сертификации «Халяль» Совета муфтиев России -

единственный орган по сертификации «Халяль» на территории Российской Федерации, получивший соответствующие полномочия от Председателя Совета муфтиев России, Председателя Духовного управления мусульман Европейской части России, Муфтия шейха Равиля хазрата Гайнутдина.

- Система добровольной сертификации по канонам Ислама – Система «Халяль» («Halal») зарегистрирована в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт).
- Сотрудники центра имеют многолетний богатый опыт в сертификации продукции и услуг «Халяль».
- Сертифицированы более 200 российских и зарубежных компаний.
- Более 20 компаний вывели свою продукцию на экспорт.
- Сертификат «Халяль», полученный в Международном Центре стандартизации и сертификации «Халяль» Совета муфтиев России признаётся во всём Исламском мире.



SMIC



HDC



ВНИИС
VNIIS



Халяль – Вера, Разум, Безопасность (в обоих мирах)!



Международный Центр Стандартизации и сертификации
"Халяль" Совета муфтиев России
Россия, 129090, Москва, Выползов пер., д. 7, оф. 203
тел./факс: +7 (495) 688-95-09, +7 (495) 926-03-10
www.halalcenter.org e-mail: halal.smr@gmail.com