

# ЗДОРОВЫЙ МИКРОБИОМ КУР

Г. Лаптев, Е. Йылдырым, Л. Ильина, В. Филиппова, Е. Горфункель, А. Дубровин, Н. Новикова, Д. Тюрина

В наше время уже не вызывает сомнений важнейшая роль нормальной микрофлоры, населяющей желудочно-кишечный тракт птицы. Фактически совокупность кишечных микроорганизмов — это дополнительный орган, выполняющий свои собственные незаменимые функции: переваривание кормов, поддержание иммунитета, защита от патогенов и пр.

Условно-патогенная микрофлора (некоторые энтеробактерии, актиномицеты и другие) у здоровых птиц 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 птиц и массовой гибели.

У птиц в просвете пищеварительного канала всегда присутствуют все три данные 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, частой смене рационов, заболеваемости, снижении иммунитета, нарушении условий содержания, стрессовых факторах условно-патогенная и патогенная микрофлора начинают получать конкурентное преимущество.

## Контролировать микробиом смогли российские ученые

Давно доказано, что лишь 1–5% микробов кишечника могут расти на питательных средах. К тому же предварительное культивирование микроорганизмов с помощью классических методов микробиологии позволяет получить картину, весьма отдаленную от истинной структурной организации, путей метаболизма и межмикробных взаимоотношений бактерий в естественной среде обитания.

Поэтому за рубежом основным инструментом для исследования микробных сообществ, в том числе микробиома желудочно-кишечного тракта кур, стали молекулярно-генетические методы. Наибольшие успехи в познании природного разнообразия микробов достигнуты с помощью метагеномных методов, основанных 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 для изучения почвы и кала человека. Учеными, в 2012 году впервые применившими данный метод для исследования бактерий кишечника кур, стали сотрудники молекулярно-генетической лаборатории компании «БИОТРОФ». Методику инициативные и молодые ученые воспроизводили и модифицировали самостоятельно.

Это позволило специалистам ООО «БИОТРОФ» сделать ряд научных открытий мирового уровня. Например, стало известно, что многочисленные вакцинации в птицеводстве приводят к появлению так называемой «вторичной» микрофлоры, которая представляет значительную проблему для здоровья птицы.

Традиционно считалось, что желудочно-кишечный тракт эмбрионов птиц стерилен, а формирование микробиоценоза пищеварительной системы птенцов происходит после вылупления в результате контакта с окружающей средой. 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 ЖКТ птиц на стадии эмбрионального развития внутри яйца. Так, например, в ЖКТ эмбрионов выявлялись бактерии *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* и *E. coli*, способные вызывать омфалит (пупочно-желточную инфекцию) — опасное заболевание, которое является основной причиной смертности цыплят начиная с момента вылупления до 14 дней жизни.

Мощным толчком в развитии фундаментальных исследований в компании «БИОТРОФ» стало приобретение в начале 2018 г. высокопроизводительного секвенатора компании Illumina новейшего поколения (рис. 1). Это дорогостоящее оборудование позволяет получить огромный объем данных с высочайшей точностью анализа микробов до вида за один «прогон».

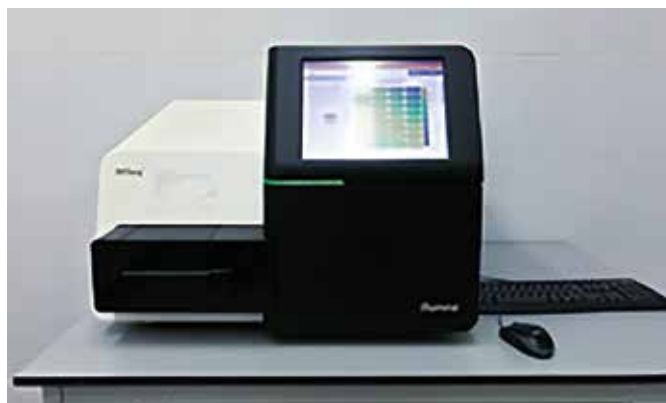


Рис. 1. Секвенатор MiSeq, Illumina  
(лаборатория ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург)

Учеными компании «БИОТРОФ» метод NGS-секвенирования уже был с успехом применен при исследовании содержимого кишечника бройлеров, что позволило отследить изменения микрофлоры на фоне использования различных рационов. Так, например, специалисты обнаружили, что при замене в составе рациона 25% комбикормов на подсолнечный шрот количество бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* (включающих патоген *Erysipelotrix insidiosus*) снизилось в 2,5 раза, бактерий рода *Escherichia* (включающих кишечную палочку) — в 55 раз.

## Нормы содержания микрофлоры

В связи с вышеизложенным возникает вопрос: на какие количественные диапазоны содержания бактерий тех или иных групп необходимо ориентироваться при оценке состояния микробиома желудочно-кишечного тракта кур?

Дело в том, что до 2014 года данный вопрос оставался в тени. На базе ООО «БИОТРОФ» с использованием молекулярно-генетического метода T-RFLP был проведен широкий мониторинг исследований микрофлоры, населяющей пищеварительный тракт 350 клинически здоровых и больных цыплят-бройлеров разных возрастов.

В результате биоинформатической обработки данных ученым удалось обнаружить интересную закономерность. Была выявлена зависимость между снижением продуктивности бройлеров и увеличением в кишечнике условно-патогенных и патогенных форм (стафилококков, фузобактерий) при одновременном падении численности полезных бактерий, таких как лактобактерии и бациллы (рис. 2).

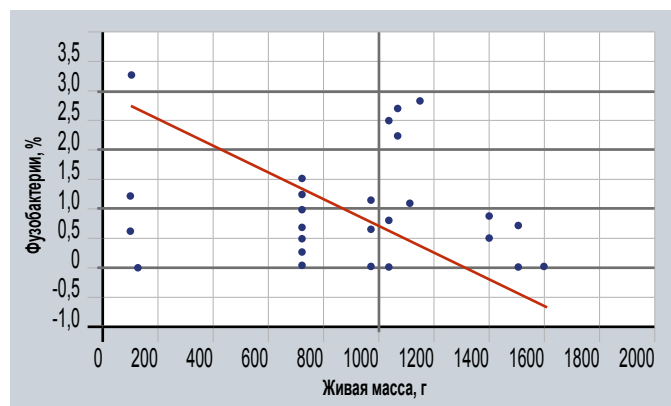
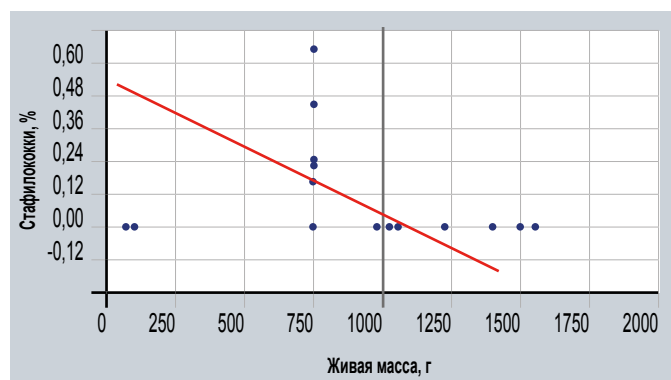
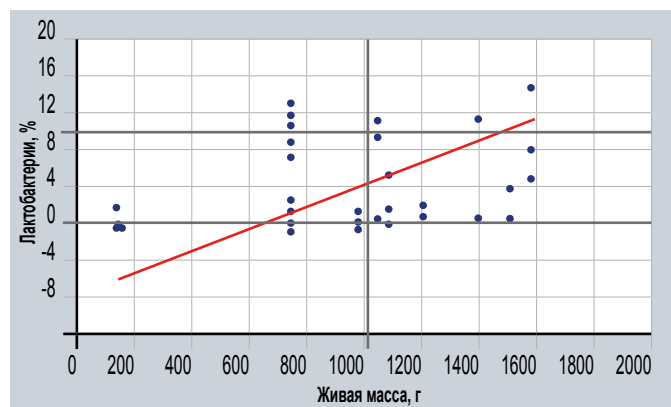


Рис. 2. Связь между количеством некоторых групп бактерий в слепых отростках ЖКТ бройлеров и продуктивностью

Исследователи сделали вывод, что численность данных микроорганизмов в ЖКТ может являться индикатором состояния здоровья птицы.

Выявленная зависимость позволила разработать достаточно четкие нормы содержания некоторых основных групп микроорганизмов в слепых отростках ЖКТ здоровых цыплят-бройлеров. Важно и интересно, что данные нормы были разработаны исследователями с учетом возраста птицы.

Разработанные нормы содержания микроорганизмов эффективно используются специалистами компании при оценке состояния микробиома желудочно-кишечного тракта кур с целью коррекции дисбиотических нарушений и правильного выбора терапии на ведущих птицефабриках.

## Межмикробные взаимодействия в кишечнике кур

В виварии ФГБНУ ВНИВИП был проведен эксперимент по скормливанию кормовой добавки производства ООО «БИОТРОФ» на бройлерах кросса Росс-308 с суточного до 43-суточного возраста. Микрофлору слепых отростков кишечника бройлеров анализировали методом T-RFLP в компании «БИОТРОФ».

В результате биоинформатической обработки данных (с помощью метода Пирсона) удалось выявить характер межмикробных взаимодействий, происходящих в кишечнике кур (рис. 3: темно-коричневые области на пересечении строк и столбцов означают выраженные достоверные обратные связи между численностью различных групп бактерий, темно-бордовые — достоверные прямые связи).

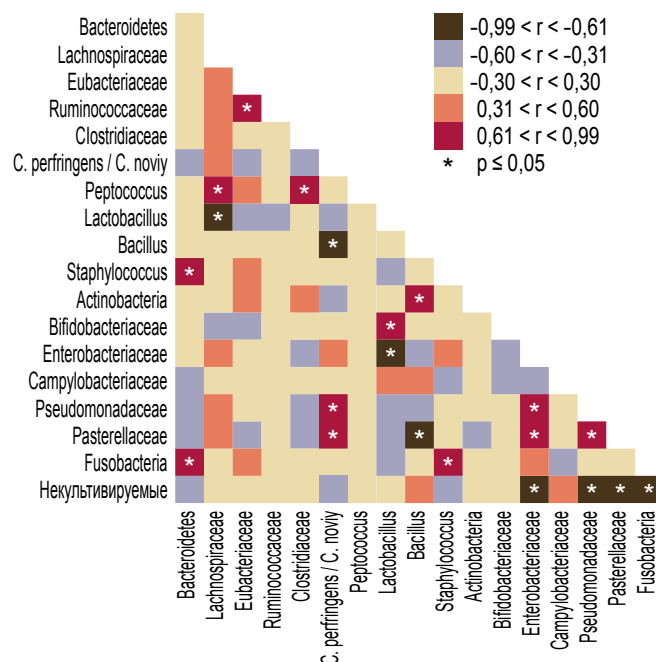


Рис. 3. Зависимость между содержанием различных групп бактерий в кишечнике бройлеров

Видно, что увеличение содержания полезных лактобактерий в слепых отростках кишечника кур было связано со снижением содержания энтеробактерий. Возрастание полезных бацилл, основы некоторых пробиотиков, в слепых отростках кишечника кур было связано со снижением численности *Clostridium perfringens* и пастерелл.

В свою очередь, увеличение *Clostridium perfringens* было связано с возрастанием патогенных для кур псевдомонад и пастерелл. Данная зависимость указывает на то, что гастроэнтериты у птиц могут протекать не только в виде моноинфекций, но также в виде смешанных инфекций.

### Кишечные патогены поражают суставы кур

В результате гастроэнтерита нередко наблюдается такое явление, как бактериальная транслокация — это миграция патогенных микроорганизмов и их токсинов из просвета кишечника в лимфатическую систему, кровь, проникновение их в большой и малый круги кровообращения и последующее инфицирование различных систем и органов птицы. Такое развитие событий чаще всего происходит при ослаблении иммунитета, в результате чего патогенные формы получают возможность нарушать эпителиальный барьер кишечника с помощью различных механизмов: деградации специфических белков, разрушения клеточного цитоскелета и др.

Специалистами компании «БИОТРОФ» на одной из птицефабрик было проведено исследование состава микрофлоры на суставах кур-несушек, павших вследствие гастроэнтерита, с применением молекулярно-генетического метода количественной ПЦР.

Полученные результаты позволили выявить интересную закономерность: у птиц с симптомами гастроэнтерита, в кишечнике которых выявляли увеличение численности ассоциаций патогенных форм, на костной ткани суставов также обнаруживали ряд условно-патогенных и патогенных бактерий — энтеробактерий, клостридий (среди которых встречаются *Clostridium perfringens* — возбудитель некротического энтерита кур), пептострептококков и дрожжей *Candida sp.* (рис. 4, 5).



Рис. 4. Микроорганизмы на суставах кур-несушек с симптомами гастроэнтерита

### Пробиотики оздоравливают микробиом

Современные интенсивные технологии выращивания сельскохозяйственных животных и птицы в нашей стране предполагают широкое применение антибиотиков. В то же время из-за постоянного и несистемного применения антибиотиков в животноводстве и птицеводстве эффективность их воздействия на организм заметно падает, так как патогенные бактерии достаточно быстро вырабатывают антибиотикорезистентность — устойчивость к данным лекарственным веществам.

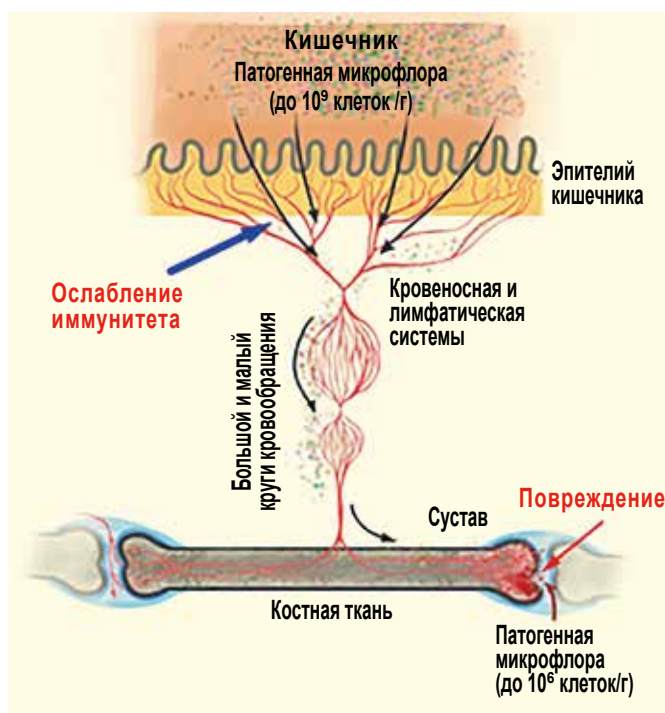


Рис. 5. Механизм поражения суставов птицы бактериями (дизайн ООО «БИОТРОФ»)

Избыточное или неправильное применение антибиотиков в животноводстве и птицеводстве неизбежно приводит к их накоплению в сверхдопустимых количествах в продуктах питания, создавая угрозу для здоровья человека, вызывая дисбиозы, аллергии, снижая иммунитет. В 2006 г. Европейский союз запретил использование антибиотиков в качестве стимуляторов роста на территории своих стран.

Необходимость решения данных проблем открывает большую перспективу в использовании натуральных пробиотических биопрепаратов в животноводстве и птицеводстве.

На сегодняшний день на рынке представлены современные пробиотики нового поколения, которые способны решать широкий спектр задач и осуществляют комплексное воздействие на макроорганизм.

Одним из таких препаратов является выпускаемый ООО «БИОТРОФ» пробиотик Целлобактерин-Т, который с успехом применяется во многих птицеводческих хозяйствах России. В производственных экспериментах показано его эффективное влияние на увеличение привесов и яйценоскости, снижение затрат кормов на единицу продукции, сохранность поголовья в мясном птицеводстве. Научно-производственная компания ООО «БИОТРОФ» является практически единственной в России, где для создания пробиотиков и комплексных сорбентов проводится направленная селекция штаммов бактерий, выделенных из ЖКТ животных и обладающих широким набором ценных свойств, в том числе абсолютной выживаемостью и конкурентоспособностью в условиях желудочно-кишечного тракта животных.

Так, основу пробиотика Целлобактерин-Т составляют специально отселектированные штаммы бактерий, обладающие высокой конкурентоспособностью в ЖКТ, антимицробной активностью в отношении нежелательных микроорганизмов, способностью расщеплять целлюлозу кормов, а также другими полезными свойствами.

Как известно, корма с большим количеством клетчатки получают практически все сельскохозяйственные животные. Однако ни одно из них не способно синтезировать целлюлазы — ферменты для переваривания основного компонента клеточных стенок — целлюлозы.

Пробиотик Целлобактерин-Т имеет в своем составе бактерии, обладающие ферментативной системой, эффективно гидролизующей некрахмалистые полисахариды, в том числе целлюлозу клеточных стенок. В рационах птицы Целлобактерин-Т эффективно повышает усвояемость не только зерновых, но также подсолнечного шрота и отрубей, что позволяет экономить на кормовых компонентах.

В лаборатории ООО «БИОТРОФ» методом T-RFLP изучали состав микрофлоры слепых отростков бройлеров кросса Cobb-500, которым скармливали пробиотик Целлобактерин-Т. Птиц выращивали в виварии ФГУП «Загорское ЭПХ» ВНИТИП (Московская область).

В результате проведения анализа состава микрофлоры слепых отростков кишечника методом T-RFLP в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ» установлено, что введение в рацион птицы Целлобактерина-Т способствовало изменению качественного и количественного состава бактериальной микробиоты и устранению дисбиотических нарушений.

У птицы опытной группы, получавшей Целлобактерин-Т, отмечено сокращение содержания клостридий (среди которых встречается *Clostridium perfringens*) в 1,2 раза, энтеробактерий — в 1,4 раза, кампилобактерий, патогенных не только для птицы, но и для человека, — в 3 раза (рис. 6).

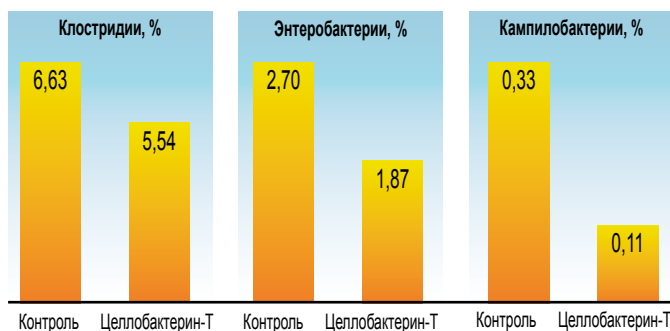


Рис. 6. Содержание патогенных форм в слепых отростках ЖКТ бройлеров, %

С изменениями в структуре бактериального сообщества оказалась связана продуктивность исследуемых цыплят-бройлеров. К концу периода выращивания бройлеров (37 сут.) в группе с Целлобактерином-Т живая масса курочек была выше на 4,2%, петушков — на 4,6% по сравнению с контролем. Переваримость сухого вещества корма в опытной группе, получавшей комбикорма с Целлобактерином-Т, была выше, чем в контроле, на 3,7%.

Использование Целлобактерина-Т оказало влияние на накопление витаминов в печени бройлеров. Отмечена тенденция к увеличению по сравнению с контролем количества витаминов: А — на 8,9%, Е — на 22,1%; В2 — на 12,4%, каротиноидов — на 9,2% в группе с использованием Целлобактерина-Т.

Необходимо отметить, что Целлобактерин-Т отличается от обычных препаратов повышенной термостойкостью, поэтому сохраняет свои свойства даже после экспандирования и гранулирования при температуре до 105°C.

**БИОТРОФ**

**ФИТОПРОБИОТИК**  
→ Провитол  
Обладает антимикробным, антиоксидантным, противовоспалительным действием.

**СОРБЕНТ-РЕГУЛЯТОР**  
→ ЗАСЛОН  
Защитит от токсинов.

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОБИОТИКИ**  
→ Целлобактерин+  
→ Целлобактерин-Т  
Помогают усвоить: подсолнечный шрот, пивную дробину, отруби, зерно. Укрепляют здоровье и иммунитет.

**БИОКОНСЕРВАНТЫ**  
→ Биотроф  
→ Биотроф-111  
→ Биотроф-600

**СУХОЙ БИОКОНСЕРВАНТ**  
→ Промилк  
Сохраняют: силос, сенаж, зерносенаж, плющенное зерно.

**(812) 322.85.50**  
микробиология для животноводства  
[www.biotrof.ru](http://www.biotrof.ru)

### Фитобиотики повышают иммунитет

Фитобиотики — это группа биопрепаратов растительного происхождения с антибактериальными свойствами.

Самый популярный из таких препаратов — фитобиотик Интебио (ООО «БИОТРОФ»), который состоит из композиции эфирных масел, обладающих уникальными антибактериальными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами. Использование препарата в птицеводстве позволяет снизить, а в некоторых случаях даже полностью исключить использование антибиотиков.

Так, в условиях вивария ВНИВИП был проведен эксперимент по выращиванию бройлеров кросса Росс-308 с применением фитобиотика Интебио.

В эксперимент были введены группы с заражением птиц патогенным штаммом бактерии *Salmonella enteritidis*. Логика выбора данного патогена связана с тем, что, по данным Россельхознадзора, сальмонеллез является одной из наиболее частых инфекционных болезней в птицеводстве.

Таким образом, были сформированы следующие опытные и контрольные варианты:

- 1) контроль без заражения и без лечения;
- 2) *Salmonella enteritidis*;
- 3) *Salmonella enteritidis* + Интебио;
- 4) Интебио.

В молекулярно-генетической лаборатории компании «БИОТРОФ» был проведен анализ экспрессии генов синтеза белков интерлейкина 6 и интерлейкина 8, ответственных за врожденный иммунный ответ организма хозяина. При заражении патогенами выделяемые клетками Т-хелперами интерлейкины подключают к борьбе В-лимфоциты, которые начинают производить «оружие особой точности» — антитела.

Экспрессия (работа) генов — это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок. Таким образом, анализ экспрессии генов при помощи наблюдения за РНК позволяет обнаружить, какие гены активируются в ответ на то или иное воздействие на организм, что приводит к запуску синтеза соответствующего белка.

Анализ экспрессии генов синтеза белков интерлейкина 6 и интерлейкина 8 у бройлеров проводили при помощи метода количественной ПЦР в комбинации с методом обратной транскрипции. Выбор данного метода был обусловлен тем, что он способен «работать» в широком диапазоне начальных концентраций определяемого транскрипта, детектируя его единичные копии.

Расчет уровня относительной экспрессии был произведен при помощи метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

На рис. 7 показан уровень экспрессии генов синтеза интерлейкина 6 и интерлейкина 8 у бройлеров в относительных единицах по отношению к контролю. Из графиков видно, что заражение бройлеров культурой *Salmonella enteritidis* вызывало определенный иммунный ответ у бройлеров, который выражался в повышении уровня экспрессии генов синтеза интерлейкинов 6 и 8 (в 1,62 и 1,74 раза соответственно). Введение в рацион фитобиотика Интебио на фоне заражения сальмонеллой способствовало увеличению экспрессии синтеза интерлейкина 6 в 4 раза,

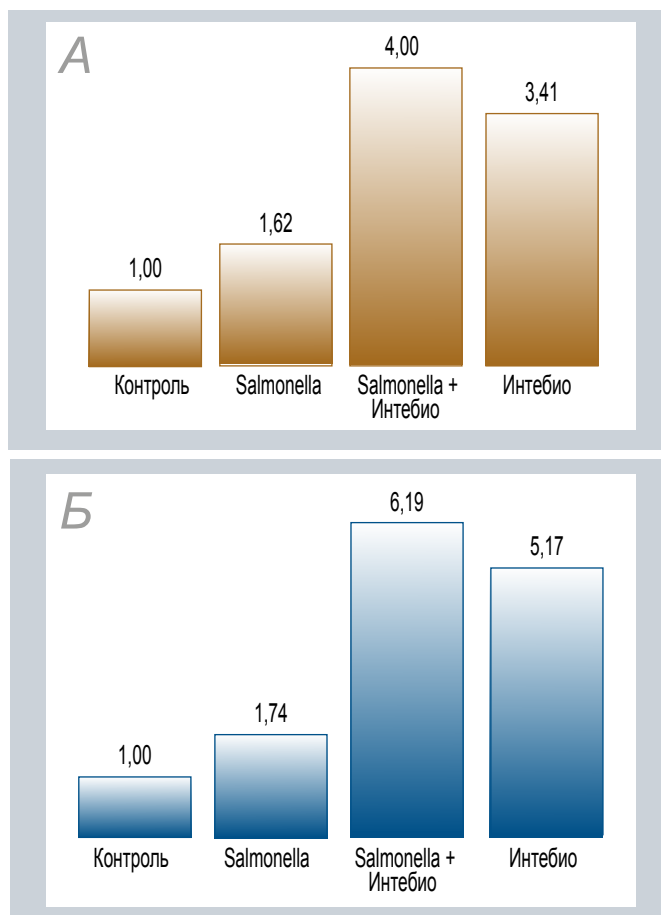


Рис. 7. Уровень экспрессии (активации) генов синтеза: А — интерлейкина 6, Б — интерлейкина 8

а интерлейкина 8 в 6,19 раза по отношению к контролю. Интересно, что введение в рацион Интебио без заражения сальмонеллой также способствовало увеличению уровня экспрессии синтеза интерлейкинов 6 и 8 в 3,41 и в 5,17 раз соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о выраженных иммуномодулирующих свойствах фитобиотика Интебио, поскольку он стимулирует активный иммунный ответ у бройлеров, что сопровождается увеличением продуктивности.

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

Избыточное или неправильное применение антибиотиков в птицеводстве неизбежно приводит к их накоплению в сверхдопустимых количествах в продуктах питания, создавая угрозу для здоровья человека. Поэтому основным инструментом борьбы с патогенами (в том числе с возбудителем некротического энтерита кур) должно стать оздоровление микробиома кишечника с учетом принципов саморегуляции. Необходимость решения данных проблем открывает большую перспективу использования в птицеводстве натуральных пробиотиков и фитобиотиков.