

Применение молекулярно-генетических методов анализа для оценки действия синбиотика «Поултри Стар» на микробиом кишечника цыплят-бройлеров

Шкарлат П.Е. к.б.н.

Научно-технический директор DSM
Кормление и Здоровье животных
Россия

ANIMAL NUTRITION AND HEALTH

ESSENTIAL
PRODUCTS

PERFORMANCE
SOLUTIONS +
BIOMIN®

PRECISION
SERVICES



DSM

BRIGHT SCIENCE. BRIGHTER LIVING.

ВИТАМИНЫ И ПРЕМИКСЫ

- [Redacted text block]

- [Redacted text block]

- [Redacted text block]

КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ И ФЕРМЕНТЫ+ BIOMIN®

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



Лабораторные решения

[Redacted text]

- [Redacted text]
- [Redacted text]
- [Redacted text]

«Молекулярно-биологические методы изучения микробиоты кишечника птицы под воздействием синбиотика «Поултри Стар»»

Коллектив сотрудников компании DSM и сотрудников кафедры зоогигиены и птицеводства имени А.К. Даниловой

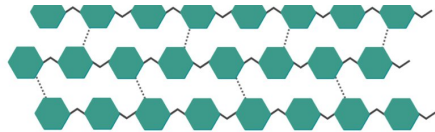


Руководитель исследования Доцент
кафедры зоогигиены и птицеводства
имени А.К. Даниловой, кандидат
сельскохозяйственных наук, доцент
Мясникова Ольга Вячеславовна



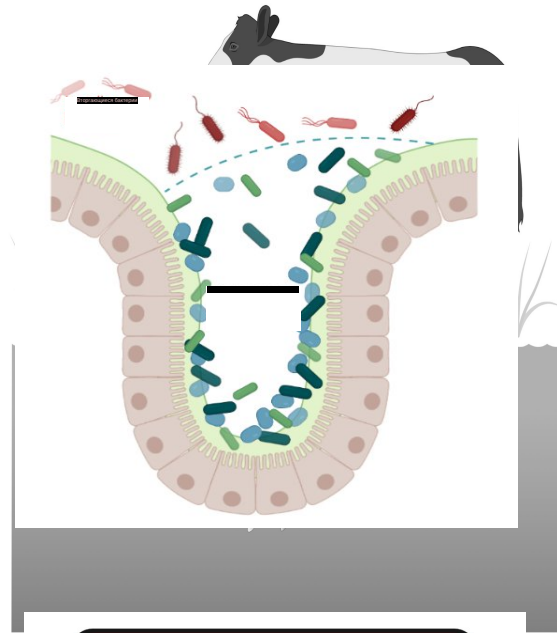
Как микробиом кишечника приносит пользу хозяину?

Питание
 Участие в переваривании
 компонентов рациона
 Расщепление неусваиваемых
 компонентов корма
 (клетчатки)

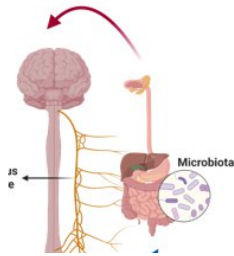


Питание
 Биосинтез витаминов
 (витамины группы В,
 витамин К), АМК и
 ферментов.
 Водно-солевой обмен

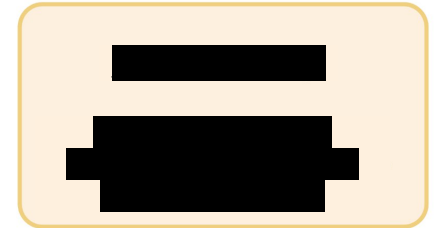
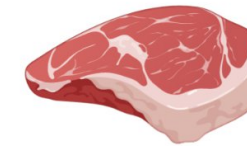
Питание
 Участие в биосинтезе
 нейромедиаторов
 дофамина, серотонина.



Снижение стресса
 Выработка
 нейромедиаторов
 с транквилирующим
 действием



«Если микробы контролируют мозг, то
 они контролируют все».
 - Джон Ф. Крайан



Иммунитет
 Участие в формировании,
 развитие и тренировка
 иммунокомпетентных
 органов и тканей
 иммунной системы

Иммунитет
 Выработка
 антимикробных в-в (Аб,
 бактериоцины)

Иммунитет
 Защита от повреждения эпителия и
 проникновения в кровь микрофлоры,
 колонизационная резистентность

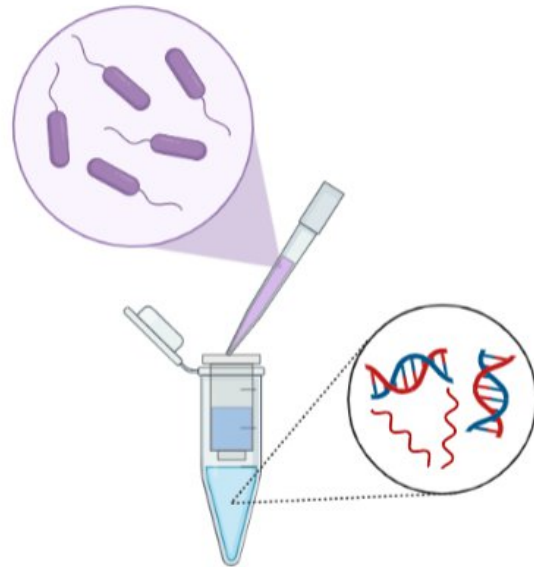


Основные вопросы и методы изучения микробиома

1. Какие микроорганизмы?
2. Их функции?
3. Их взаимодействие?



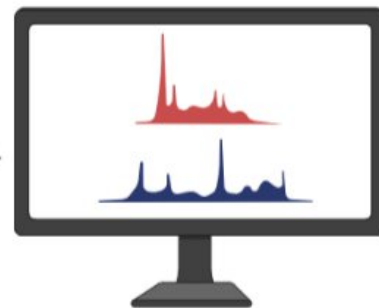
1 [Redacted]



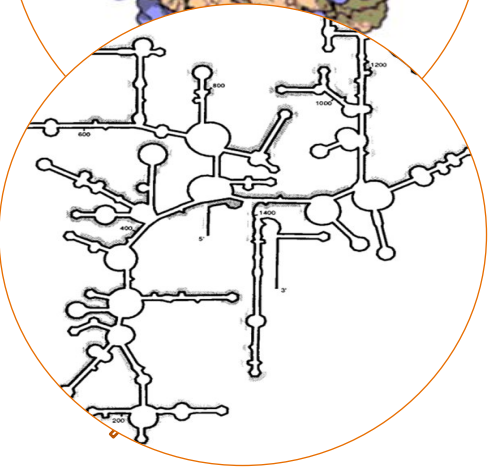
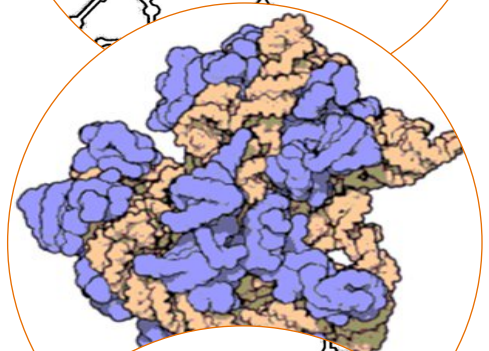
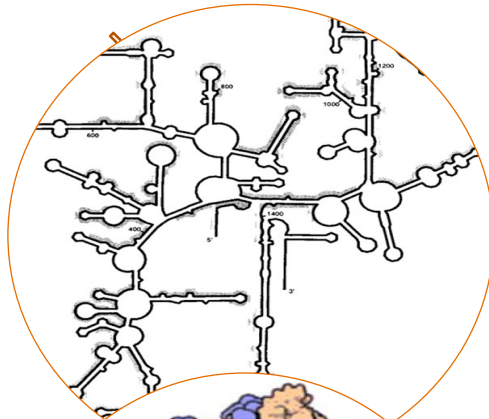
2 [Redacted]



3 [Redacted]



Современные молекулярно-генетические методы исследования микробиома



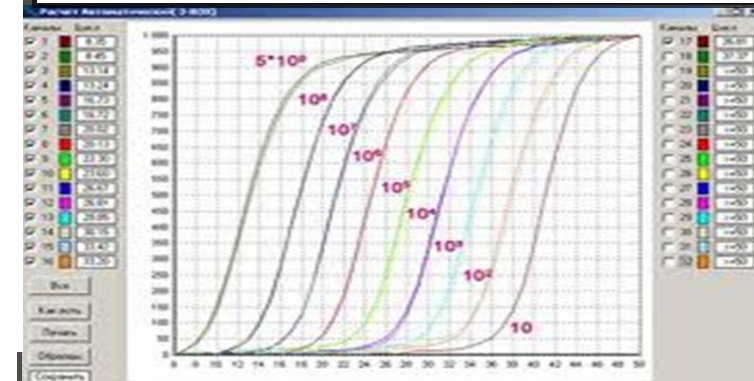
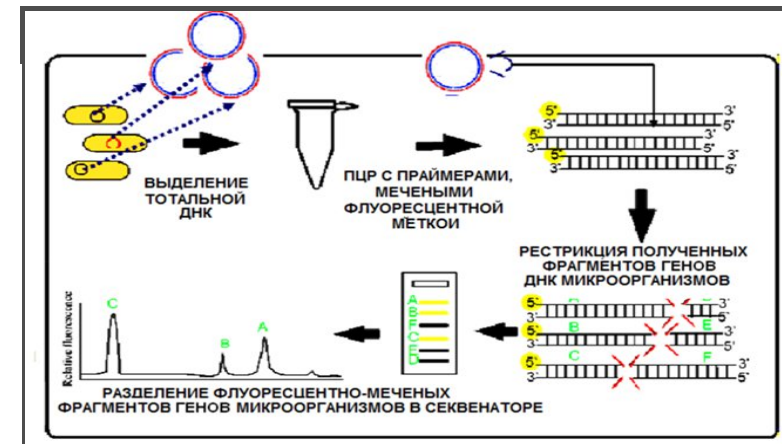
T-RFLP –

определение длины нуклеотидных фрагментов генов бактерий, архей

NGS – определение нуклеотидной последовательности генов бактерий

RT-PCR –

определение количества нуклеотидных фрагментов генов бактерий, архей, грибов



Для чего используются современные молекулярно-генетические методы исследования микробиома :

- **оценивать состояние микробиома ЖКТ в стаде и выявлять заболевания, протекающих даже в субклинических формах;**
- **разрабатывать приемы направленной регуляции микробиома кишечного тракта;**
- **определять эффективность применения регуляторов пищеварительной системы (различных добавок, фитобиотиков, пробиотиков, кормовых антибиотиков и др.).**

Цель исследования

- Оценить влияние синбиотика «ПоултриСтар» на изменение общего микробного числа и микробного профиля слепых отростков цыплят-бройлеров.

PoultryStar®

Состав пробиотических бактерий:

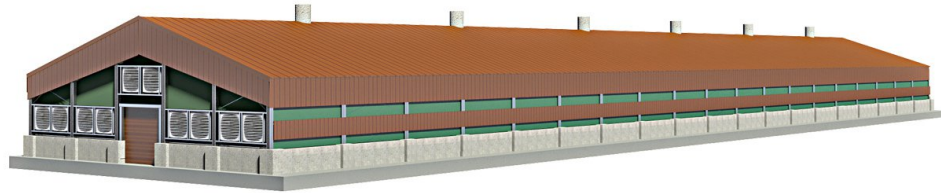
Enterococcus faecium (штамм DSM 21913) – не менее $3,0 \times 10^{12}$ КОЕ/кг
 Bifidobacterium animalis (штамм DSM 16284) – не менее $1,5 \times 10^{12}$ КОЕ/кг
 Lactobacillus salivarius (штамм DSM 16351) – не менее $5,0 \times 10^{11}$ КОЕ/кг,

Пребиотик – фруктоолигосахарид (инулин)



Схема исследования

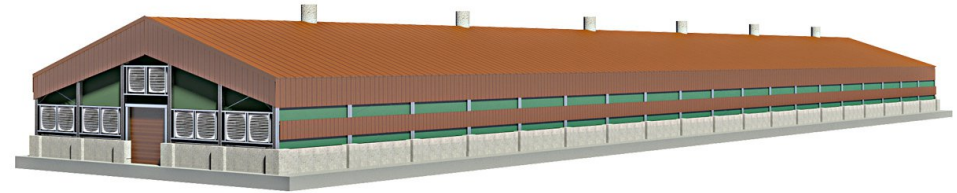
Группа 1



- Контрольный птичник
Корпус №7, 131 840 голов

- Стандартный рацион
- Срок выращивания 37 суток.

Группа 2



- Опытный птичник
Корпус №6, 166 080 голов

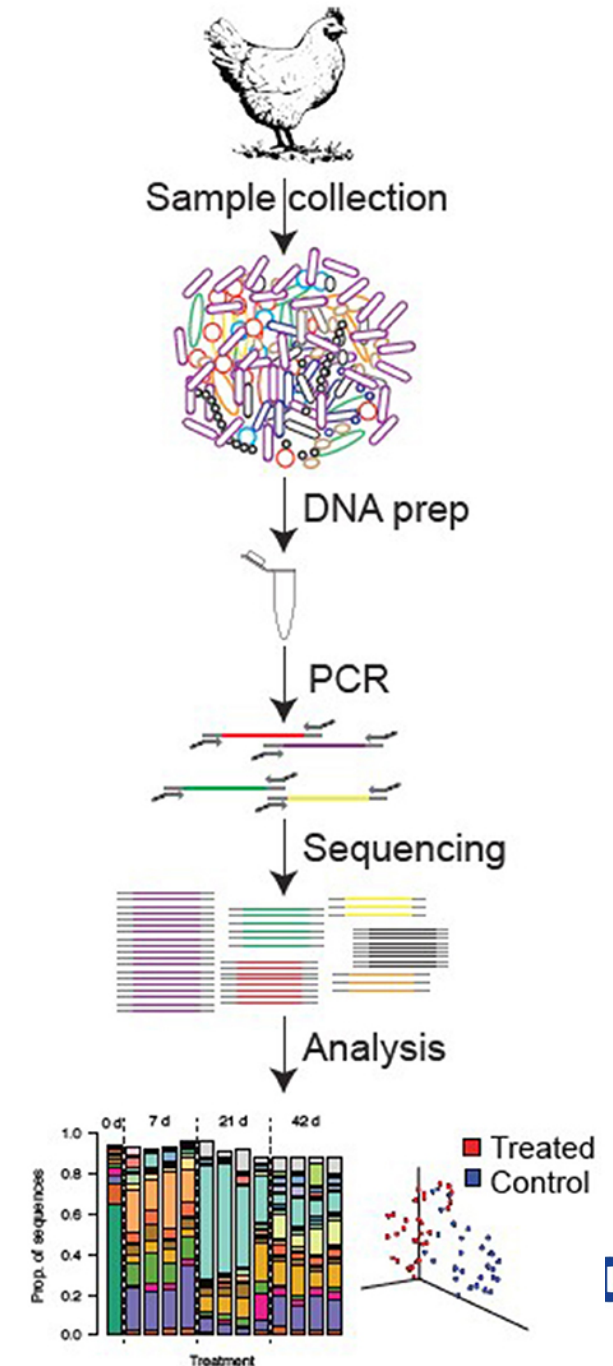
- Стандартный рацион + синбиотик «Поултри Стар» (период скармливания 1-3 недели).
- Срок выращивания 37 суток.

PoultryStar®



Схема исследования

- Эвтаназия (убой) цыплят-бройлеров в конце выращивания.
- Отбор проб содержимого слепых отростков цыплят-бройлеров (1-3 мл) с соблюдением условий асептики, по 8 голов цыплят-бройлеров из каждой группы.
- Определения общего микробного числа методом qPCR-RT.
- Определение микробного профиля слепых отростков цыплят-бройлеров в опытном и контрольном птичниках, методом NGS (Next Generation Sequencing)
- Анализ полученных данных и статистическая обработка результатов.



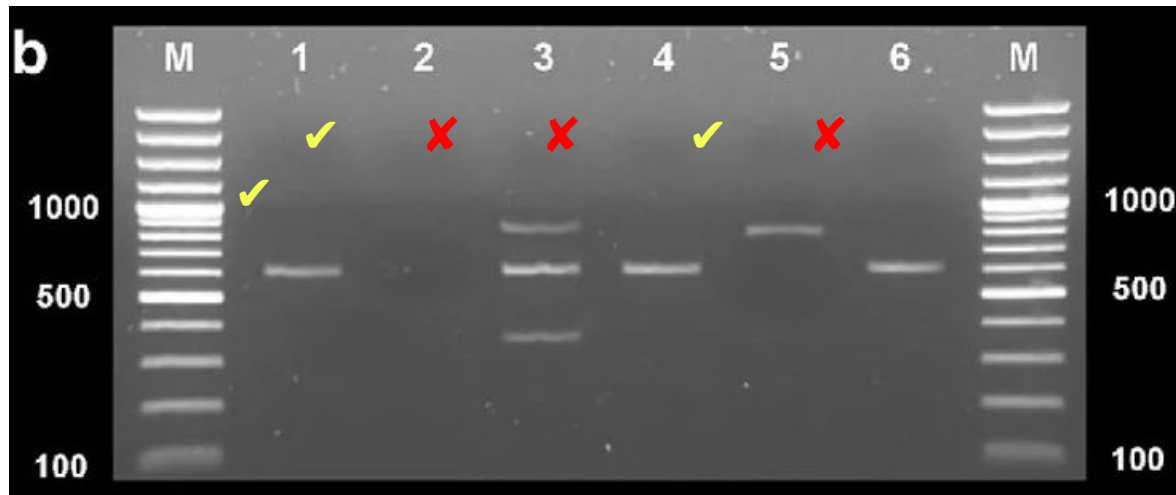
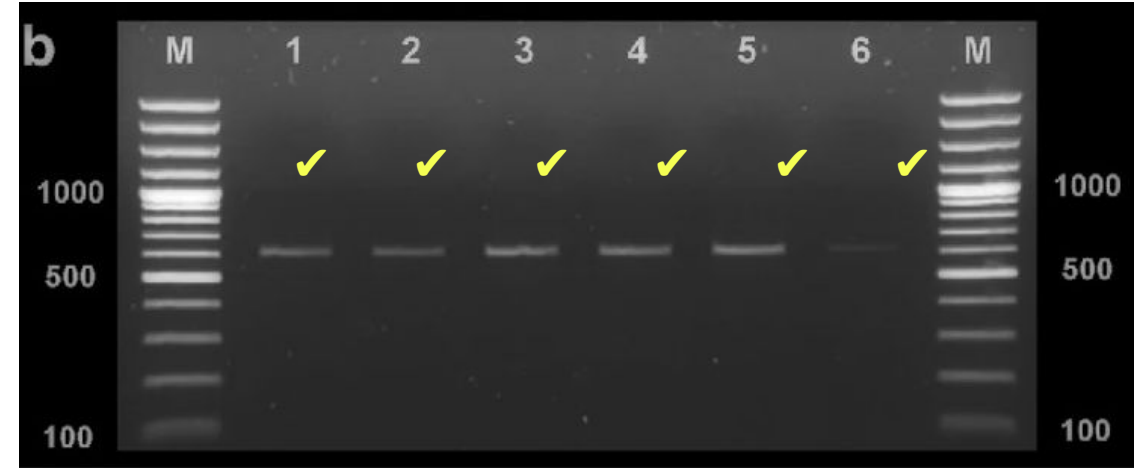
Материалы и методы

- ДНК из химуса для последующей оценки микробиома выделена с использованием набора QIAamp Power Fecal DNA Kit (QIAGEN, Германия) на автоматизированной системе QIAcube (QIAGEN, Германия).



Материалы и методы

- Качество выделенной ДНК оценивали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с добавлением бромистого этидия.



Удовлетворительные образцы:

- Образцы в 1, 4 и 6 лунках соответствуют целевому фрагменту.

Неудовлетворительные образцы :

- 2 лунка – отсутствие ДНК.
- 3 лунка – контаминация ДНК.
- 5 лунка – ДНК не соответствует длине целевого фрагмента.

Материалы и методы

• Постановка qPCR-RT:

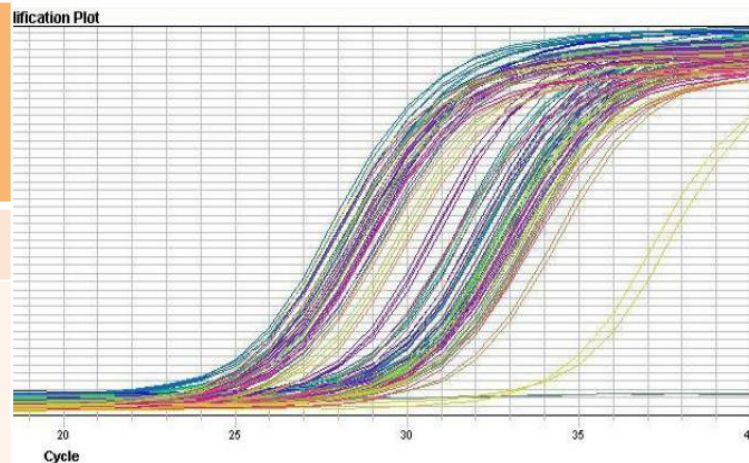
Для определения общего микробного числа готовили стоковую реакционную смесь (из расчета на одну пробирку суммарный объем 25 мкл для каждой пробы с учетом ДНК-матрицы) из следующих компонентов:

смесь Maxima™ SYBR Green / ROX Mix (2X) – 12,5 мкл, прямой праймер – 0,3 мкМ, обратный праймер – 0,3 мкМ, вода без нуклеаз – до 25 мкл с учетом объема ДНК-матрицы (добавили далее) тщательно перемешивали, и заполняли в ПЦР плашки.

При qPCR-RT использовали флуоресцентный краситель SYBR GREEN (Диаэм, Россия).

Реакцию проводили на амплификаторе LightCycler® 96 System System (Roche, Швейцария)

Шаг	Температура, °C	Время	Количество циклов
Предынкубация	95	180 с	1
Денатурация	95	13 с	40
Отжиг праймеров	57	13 с	
Элонгация	72	30 с	

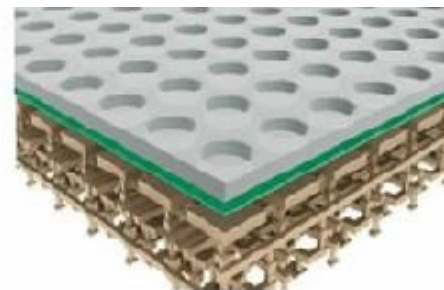


Материалы и методы

- Определение микробного профиля слепых отростков цыплят-бройлеров в опытном и контрольном птичниках, методом NGS (Next Generation Sequencing)

Пробоподготовка:

- о создание библиотеки с использованием набора Ion 16 Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific, США),
- о прикрепление к геномной библиотеке адаптеров и баркодов,
- о эмульсионная ПЦР и обогащение частиц при помощи набора Ion 520™ Chip& Ion 530™ Kit-OT2 (Thermo Fisher Scientific, США).
- о Секвенирование происходило на приборе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fisher Scientific, США). Общее число прочтений при анализе – 4 млн. по 300-400 п.н.
- о Принадлежность бактерий к определенной таксономической группе определено с использованием сетевого программного продукта Ion Reporter <https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>.



Millions of pH Sensors
Semiconductor Design



Результаты исследования

Общее микробное число бактерий в содержимом слепых отростков цыплят-бройлеров (КОЕ/г)

Результаты исследования общего микробного числа содержимого слепых отростков у цыплят-бройлеров в контрольном и опытном птичниках, полученные методом qPCR-RT.

Показатели	Контроль	Опыт
X \pm m	$5,45 \pm 0,37 \times 10^8$	$5,57 \pm 0,56 \times 10^8$
Min	$2,65 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$
Max	$9,07 \times 10^8$	$10,21 \times 10^8$

Общее микробное число слепых отростков у птицы в опытном и контрольном птичниках статистически не отличалось.

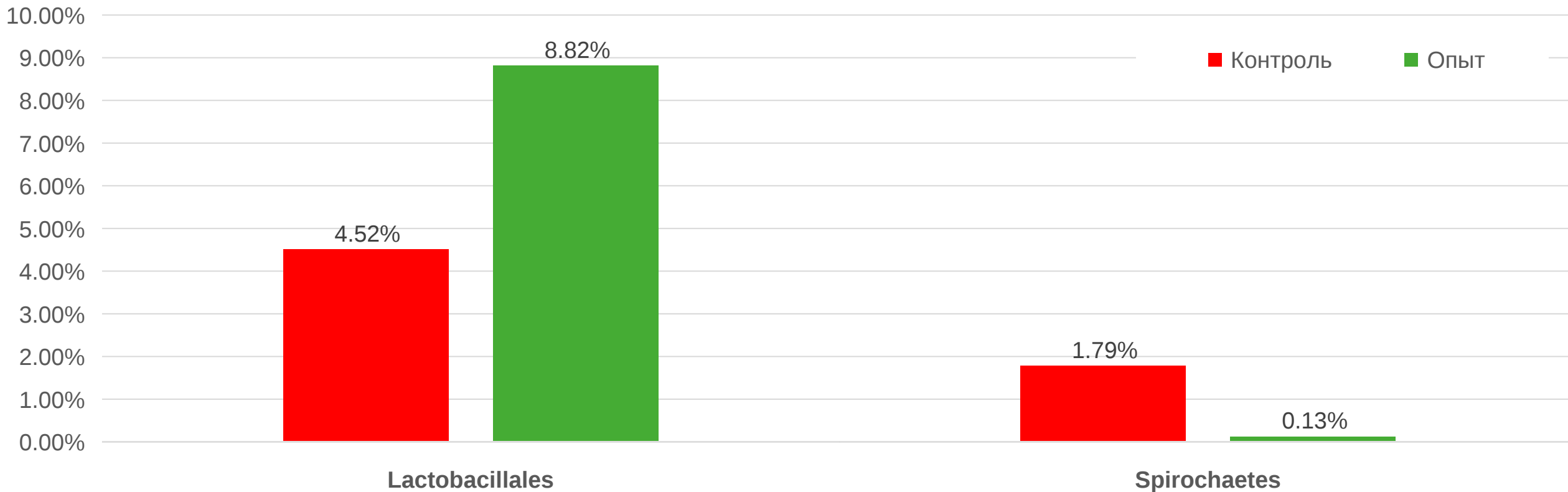
Результаты исследования состава микробиоты слепых отростков птицы, методом NGS секвенирования.

Таксоны	Доля от общего микробного числа, %		Разница опыт к контролю
	Контроль	Опыт	
Филум Actinobacteria, в т. ч.:	0,41±0,26	0,56±0,25*	+0,15
род Bifidobacteriales	0,33±0,28	0,46±0,25	+0,12
Филум Bacteroidetes	24,53±5,92	28,74±6,32	+4,21
Филум Chloroflexi	0,18±0,06	0,11±0,05	-0,07
Филум Deferribacteres	0,21±0,15	0,04±0,04	-0,16
Филум Elusimicrobia	0,01±0,00	0,01±0,00	0,0
Филум Firmicutes, в т.ч.:	51,36±7,50	49,15±4,62	-2,21
род Lactobacillales	4,52±1,37	8,82±1,26*	+4,30
род Clostridiales, в т.ч.:	42,03±6,84	36,24±5,92	-5,79
сем. Ruminococcaceae	15,96±3,57	15,27±3,26	-0,69
Филум Fusobacteria	1,20±0,48	1,17±0,68	-0,03
Филум Lentisphaerae	0,02±0,01	0,02±0,01	0,0
Филум Proteobacteria, в т.ч.:	19,64±1,88	19,80±2,58	+0,16
сем. Enterobacteriaceae	0,00±0,00	0,00±0,00	0
Филум Spirochaetes	1,79±0,76	0,13±0,11*	-1,66
Филум Synergistetes	0,12±0,05	0,05±0,02	-0,07
Филум Tenericutes, в т.ч.:	0,41±0,23	0,16±0,06*	-0,26
сем. Mycoplasmataceae	0,01±0,00	0,08±0,04	+0,07
Филум Verrucomicrobia	0,09±0,04	0,06±0,03	-0,03



Примечание: *-различия достоверны при $p < 0,05$.

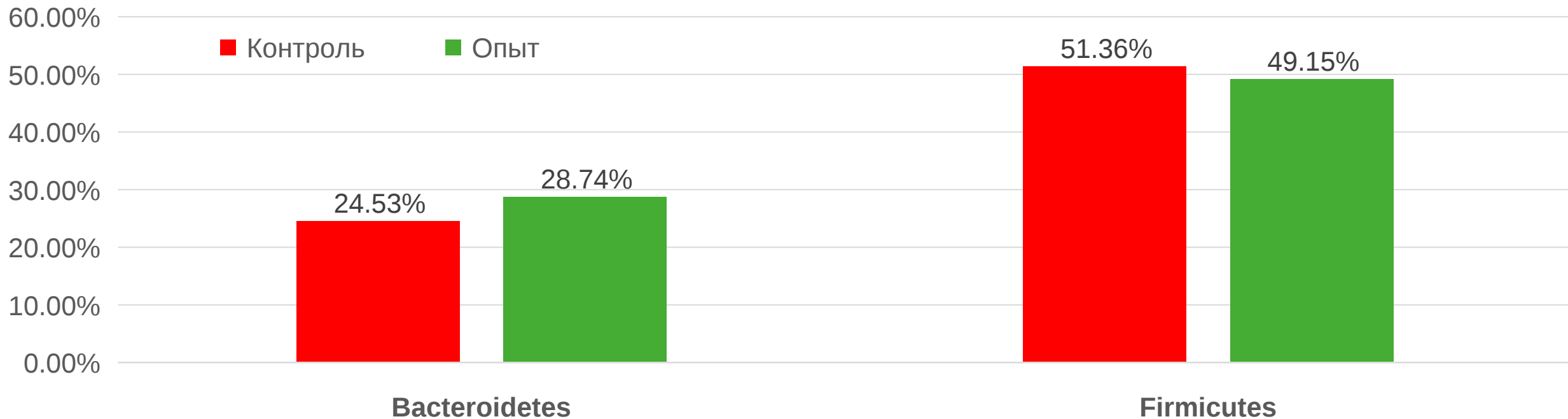
Содержание микроорганизмов рода *Lactobacillales* и филума *Spirochaetes* в пробах



Доля микроорганизмов рода *Lactobacillales* увеличилось в опытной группе на 4,3%, а доля микроорганизмов филума *Spirochetes* снизилась на 1,66%.

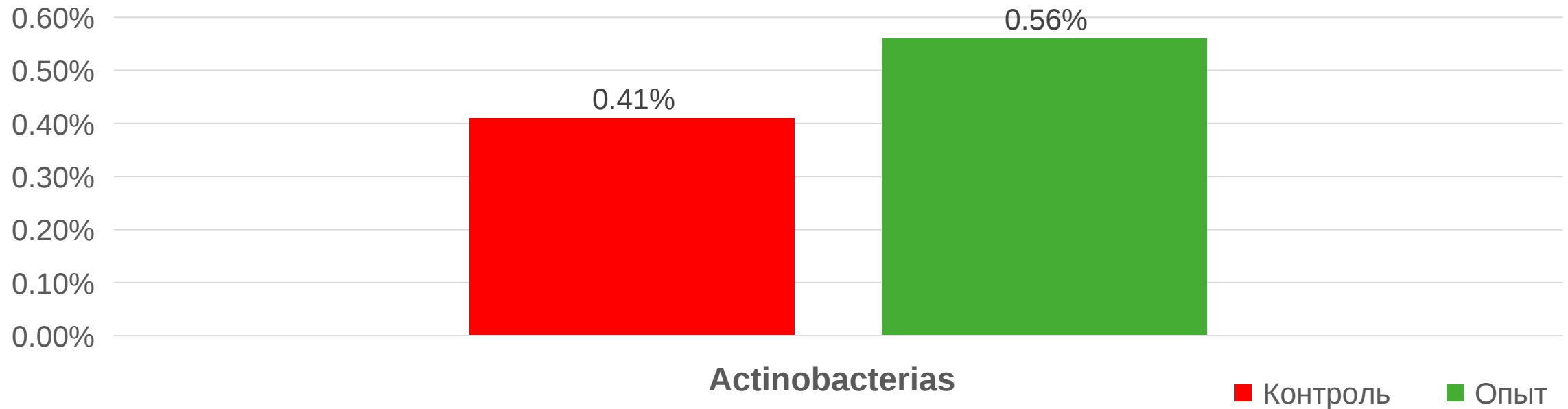


Содержание микроорганизмов филума *Bacteroidetes* и *Firmicutes* в пробах



Доля микроорганизмов филума *Bacteroidetes* увеличилась на 4,21%, а микроорганизмов филума *Firmicutes* уменьшилось на 2,21%, по сравнению с контрольной группой.

Содержание микроорганизмов рода *Bifidobacteriales* филюма *Actinobacterias* в пробах



Содержание бактерий филюма *Actinobacteria* в процентном содержании увеличились на 0,15%.



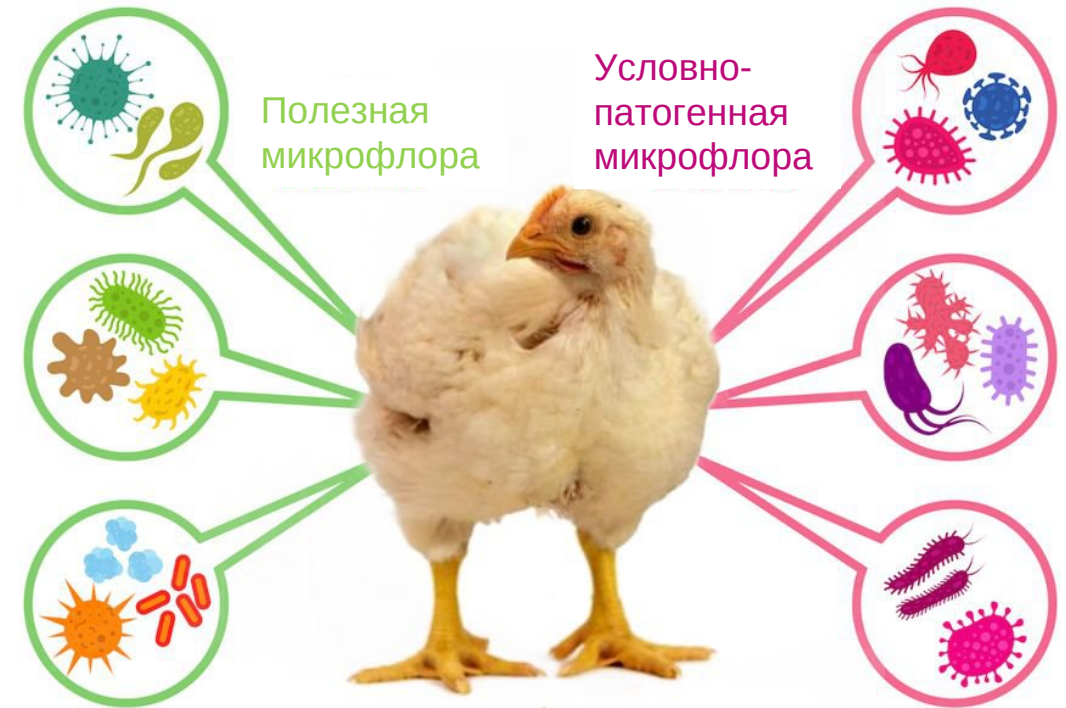
Сравнение микробного профиля слепых отростков цыплят-бройлеров в опытном и контрольном птичниках.

Таксоны	Доля от общего микробного числа, %		Разница опыт к контролю
	Контроль	Опыт	
Сумма полезных микроорганизмов, расщепляющих леллюлозу, некрахмалистые полисахариды кормов	76,30	78,45	+2,15
Сумма условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, среди которых могут встречаться возбудители инфекционных заболеваний	2,42	0,48*	-1,94

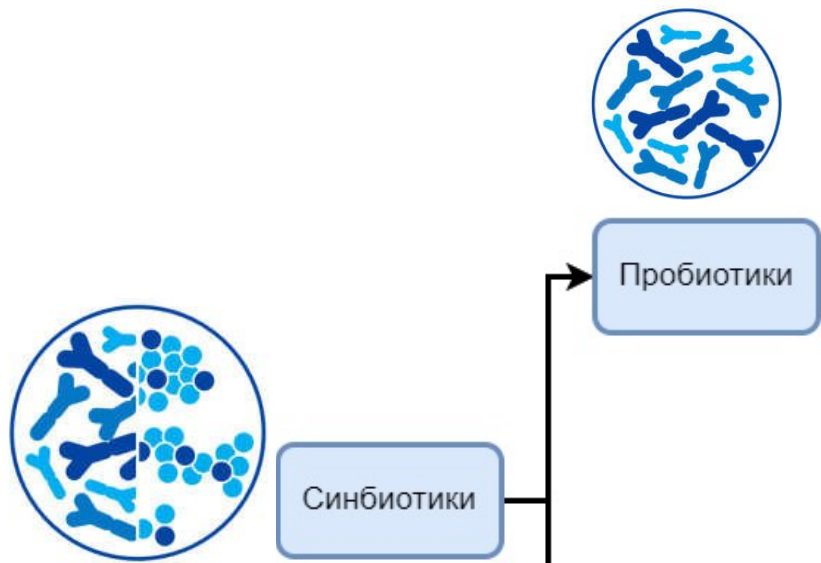
Примечание: *-различия достоверны при $p < 0,05$.

Факторы, приводящие к нарушению баланса микрофлоры кишечника цыплят-бройлеров:

- **Кормовые**
 - Микотоксины
 - Окисленный жир
 - Дисбаланс витаминов и минералов
 - Дисбаланс по незаменимым аминокислотам
 - Низкое качество воды
 - Применение кокцидиостатиков и других ветеринарных препаратов
- **Средовые**
 - Отклонения от оптимальной температуры
 - Нарушение вентиляции и повышенное содержание аммиака
- **Технологические**
 - Посадка
 - Прореживание
 - Выдержка без воды при вакцинации
 - Световая программа
- **Внутренние**
 - Инфекции (вирусные и бактериальные)
 - Вакцинации
 - Незаразные заболевания



Профилактика дисбиозов различной этиологии в птицеводстве.



PoultryStar®



Заключение

Становится понятным, что взаимодействия микробиома кишечника и метаболических процессов организма хозяина определяют состояние здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы.

Появление новых молекулярно-биологических методик позволяет достоверно определять эффективность применения регуляторов пищеварительной системы и микробиома (пробиотиков, фитобиотиков, кормовых антибиотиков и др.).

Выбирая препарат для применения в хозяйстве опирайтесь на научно-доказанные данные и передовые исследования.

PoultryStar®



BRIGHT SCIENCE. BRIGHTER LIVING.™

Павел Шкарлат к.б.н.

+7 915 370 07 25

Pavel.Shkarlat@dsm.com

