



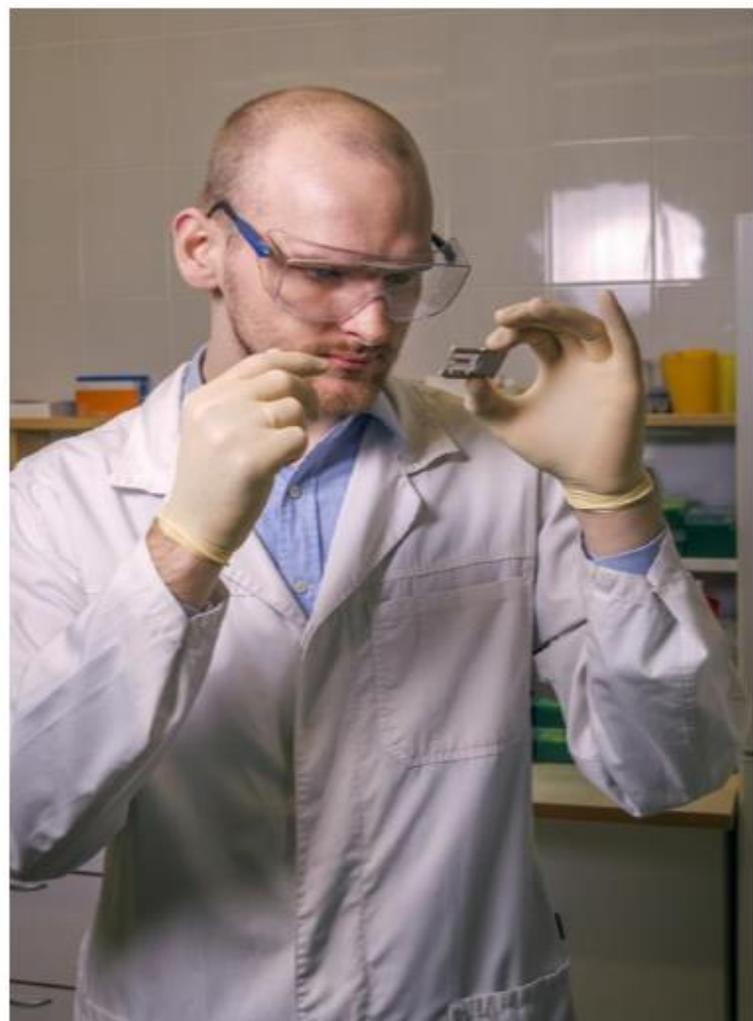
«Ветеринария в свиноводстве»

МИКРОБИОМ И ЗДОРОВЬЕ И КИШЕЧНИКА СВИНЕЙ

Ильина Лариса Александровна,
начальник молекулярно-генетической
лаборатории,

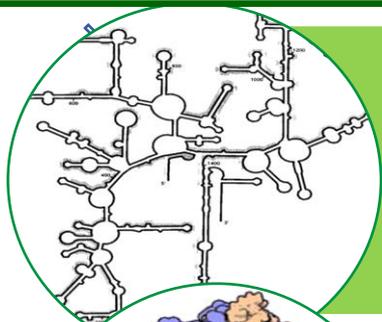
к.б.н., лауреат Премии Правительства РФ в
области науки и техники
ООО «БИОТРОФ», г. Санкт-Петербург

Новосибирск, 1 июня 2022 г.



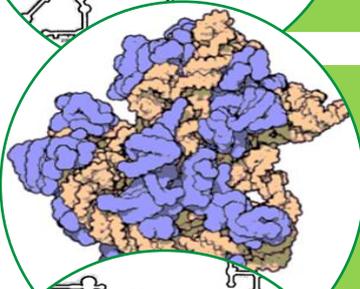


ЕДИНСТВЕННАЯ В РОССИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ООО «БИОТРОФ»



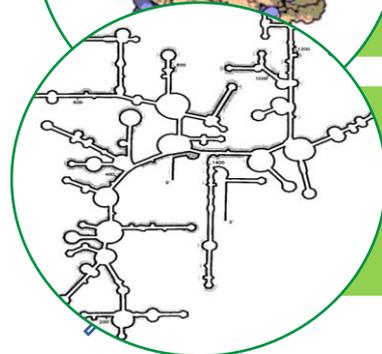
T-RFLP

- детекция **100% бактерий**
до семейства (или рода)



NGS

- детекция 100% бактерий
ДО ВИДА



RT-PCR

- **КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ** анализ
определенной группы бактерий
(например, патогенов)

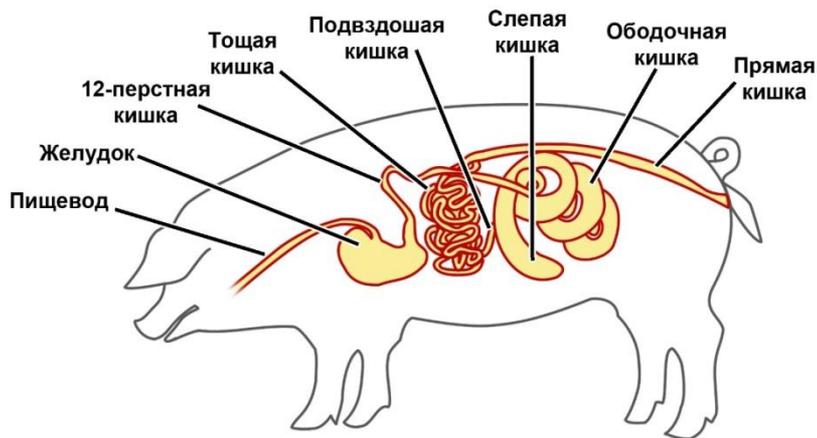


Возможности молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ»:

- ✓ Анализ 100% микроорганизмов ЖКТ - нормофлоры, условно-патогенной микрофлоры, патогенов;
- ✓ анализ микрофлоры мест содержания, подстилки, воды кормов;
- ✓ исследование микрофлоры консервированных кормов для жвачных;
- ✓ изучение содержания микотоксинов в кормах;
- ✓ контроль качества биопрепаратов на молекулярном уровне;
- ✓ полногеномное секвенирование штаммов бактерий в составе биопрепаратов;
- ✓ анализ экспрессии генов, связанных с иммунитетом и продуктивностью.



Функции симбиотической микрофлоры кишечника свиней



Метаболическая функция:

- ❑ участие в переваривании и утилизации компонентов рациона;
- ❑ синтез ферментов и витаминов;
- ❑ участие в водно-солевом обмене.

Защитная функция:

- ❑ обеспечение колонизационной резистентности;
- ❑ выработка антимикробных веществ (антибиотики, бактериоцины и т.п.);
- ❑ препятствие проникновению условно-патогенных и патогенных бактерий в кровь;
- ❑ участие в формировании иммунокомпетентных органов и тканей организма (например, лимфатической ткани пищеварительного тракта).



«ТЕМНАЯ» МАТЕРИЯ

Список некультивируемых микроорганизмов в ЖКТ:

- ✓ *Bacteroidales*
- ✓ *Bacteroidetes*
- ✓ *Flavobacteriales*
- ✓ *Porphyromonadaceae*
- ✓ *Prevotellaceae*
- ✓ *Flavobacteriaceae*
- ✓ *Sphingobacteriales*
- ✓ *Sphingobacteriaceae*
- ✓ *Acetobacteraceae*
- ✓ *Alphaproteobacteria*
- ✓ *Bacillales*
- ✓ *Eubacteriaceae*
- ✓ *Syntrophomonadaceae*
- ✓ *Lachnospiraceae*
- ✓ *Ruminococcaceae*
- ✓ *Carnobacteriaceae*
- ✓ *Enterococcaceae*
- ✓ *Lactobacillales*
- ✓ *Clostridiales_Incertae Sedis*
- ✓ *Acidaminococcaceae*
- ✓ *Selenomonadales*
- ✓ *Succinivibrionaceae*
- ✓ *Veillonellaceae*
- ✓ *Actinobacteria*
- ✓ *Actinobacteridae*
- ✓ *Actinomycetales*
- ✓ *Coriobacteriaceae*
- ✓ *Corynebacteriaceae*
- ✓ *Micrococcaceae*
- ✓ *Enterobacteriaceae*

- **Целлюлозолитики**
- **ЛЖК-синтезирующие бактерии**
- **Амилолитики**
- **Микроорганизмы с антимикробными свойствами**
- **Патогены**
- **и др.**



NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЕ: ИХ ГОРАЗДО БОЛЬШЕ, ЧЕМ ВЫ ДУМАЛИ

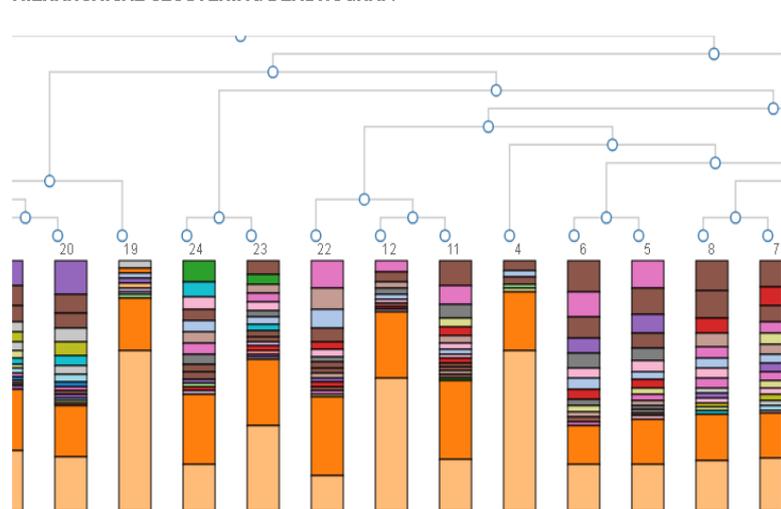


- ✓ 27 филумов;
- ✓ 173 семейства;
- ✓ 390 родов;
- ✓ 686 видов микроорганизмов.

Секвенатор 2 поколения (NGS-секвенирование):

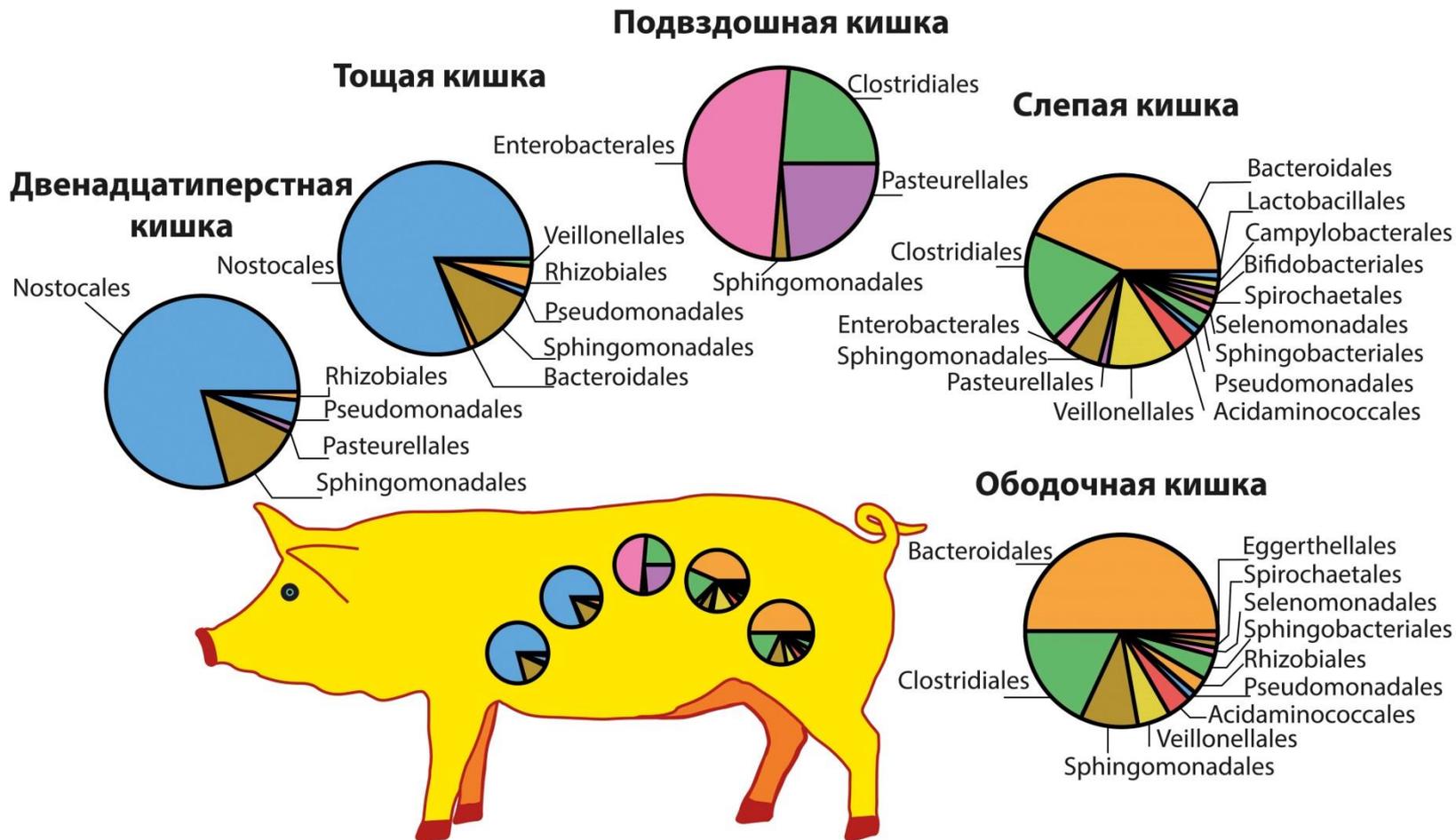
- ✓ позволяет за 1 анализ определить все 100% микроорганизмов,
- ✓ определять виды микроорганизмов
 - *Escherichia coli*,
 - *Salmonella enteritidis*,
 - и др.

HIERARCHICAL CLUSTERING DENDROGRAM





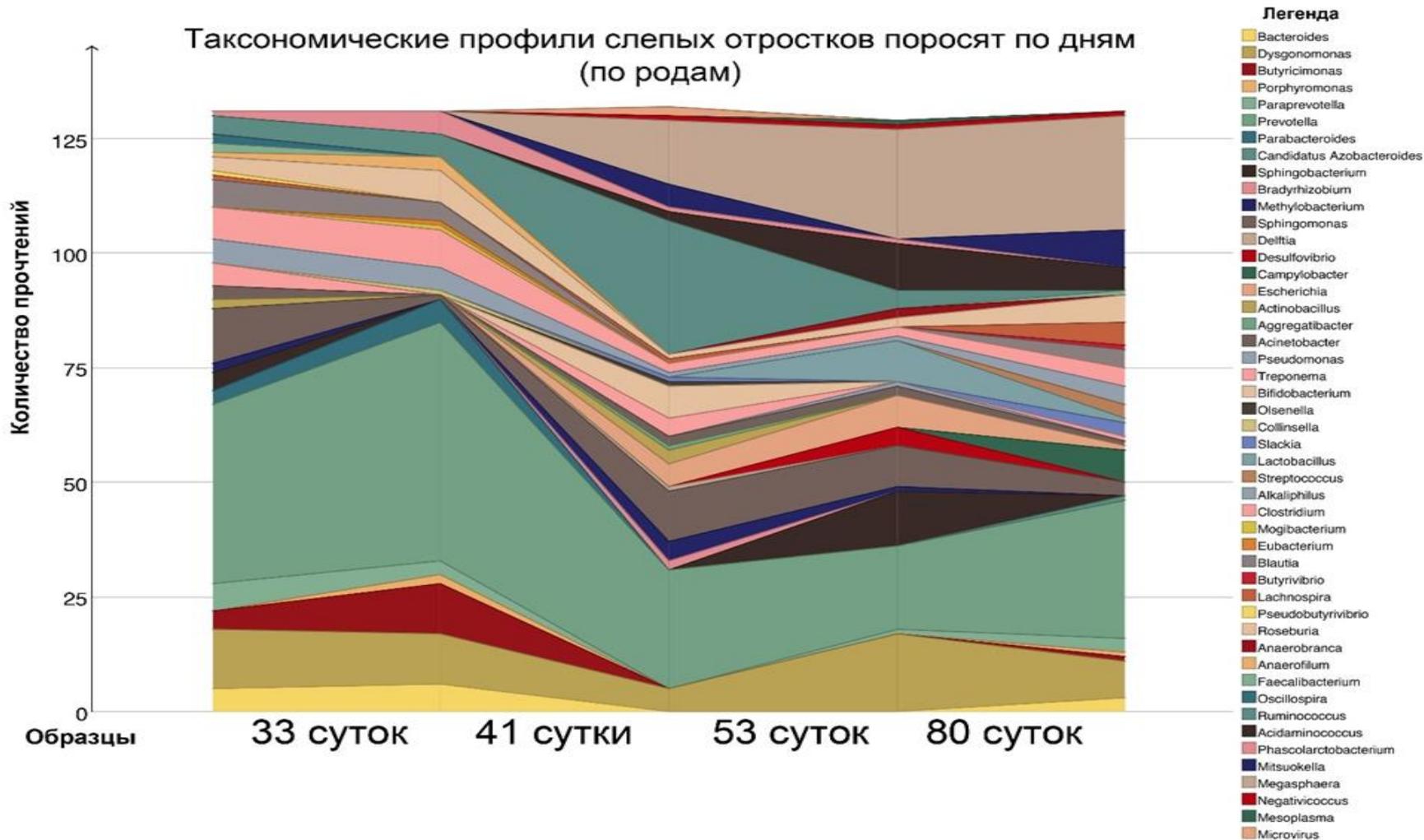
Состав микробиома ЖКТ свиней по данным NGS-секвенирования





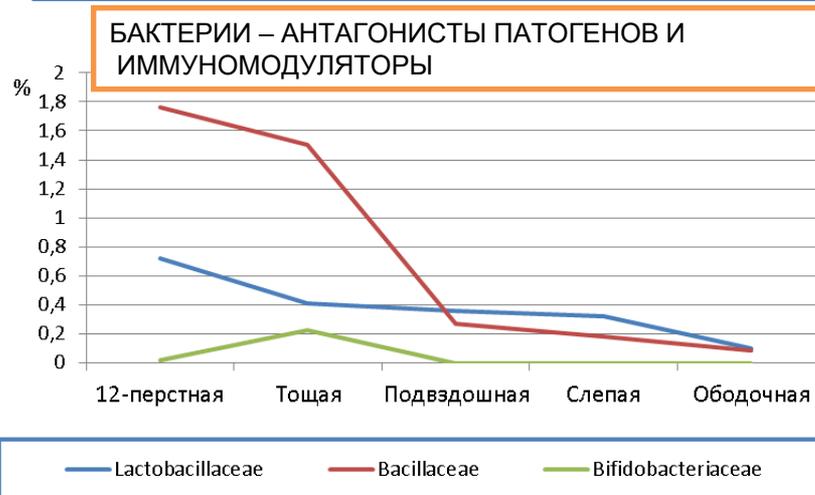
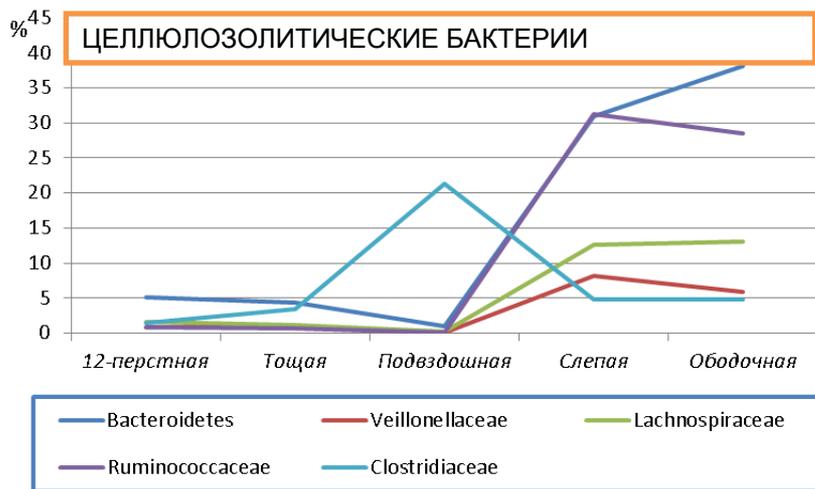
МИКРОБИОМ СВИНЕЙ

Таксономические профили слепых отростков поросят по дням (по родам)





Соотношение представленности представителей нормофлоры в различных отделах кишечника свиней, %



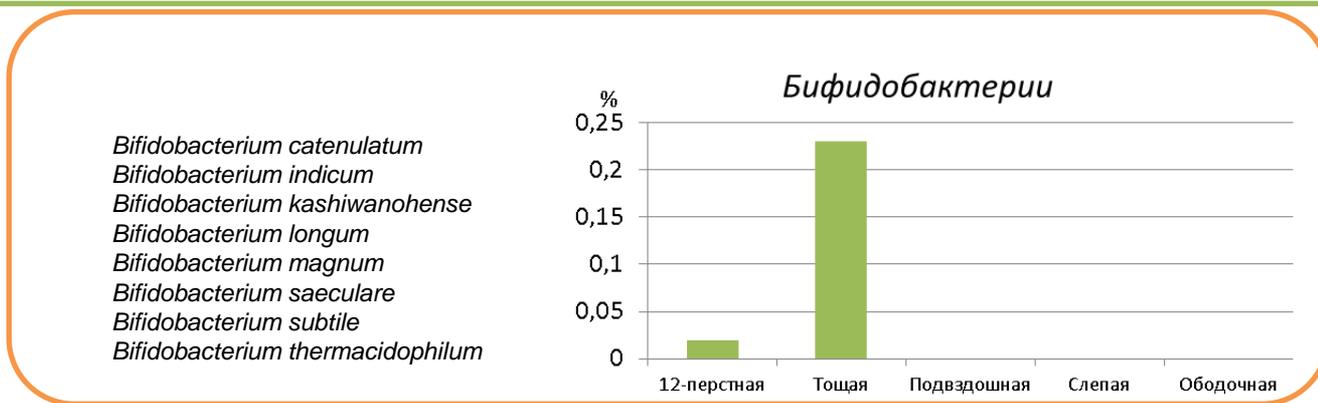
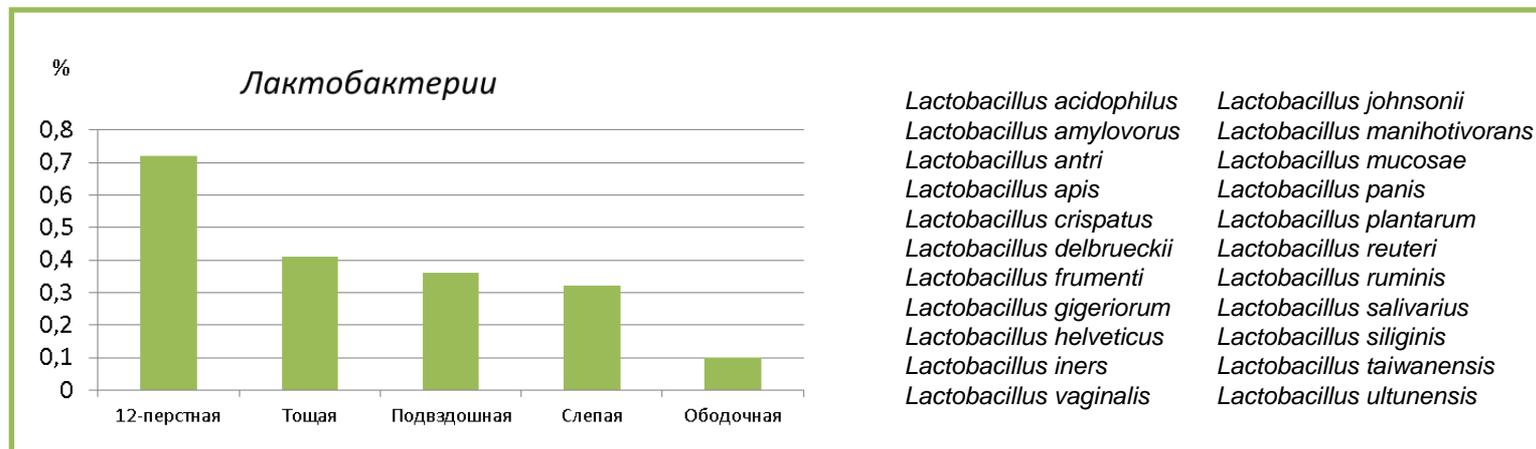
Функции:

- антимикробная активность,
- синтез антимикробных пептидов,
- иммуномодулирующая активность,
- синтез витаминов,
- синтез некоторых незаменимых аминокислот,
- синтез лактата, необходимого для производства летучих жирных кислот ЛЖК-продуцирующими бактериями,
- ферментативная активность.



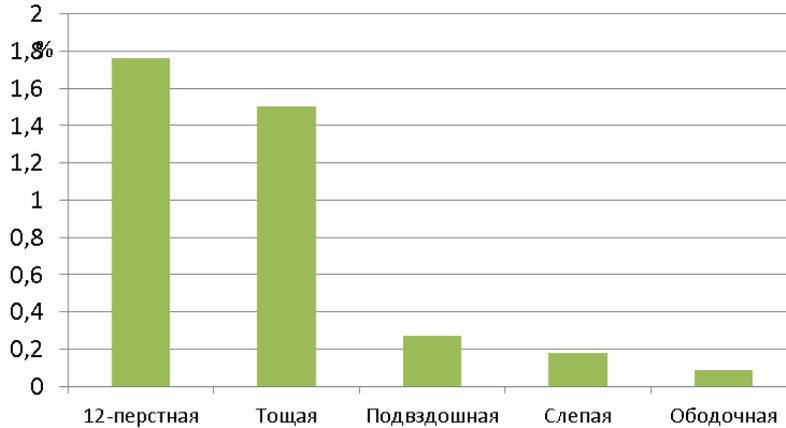
В отличие от традиционных представлений доля таких представителей нормофлоры как **лакто-, бифидобактерии, бациллы** выявлено у клинически здоровых свиней суммарно

не более 4%





Представленность бацилл в кишечнике свиней – до 2%



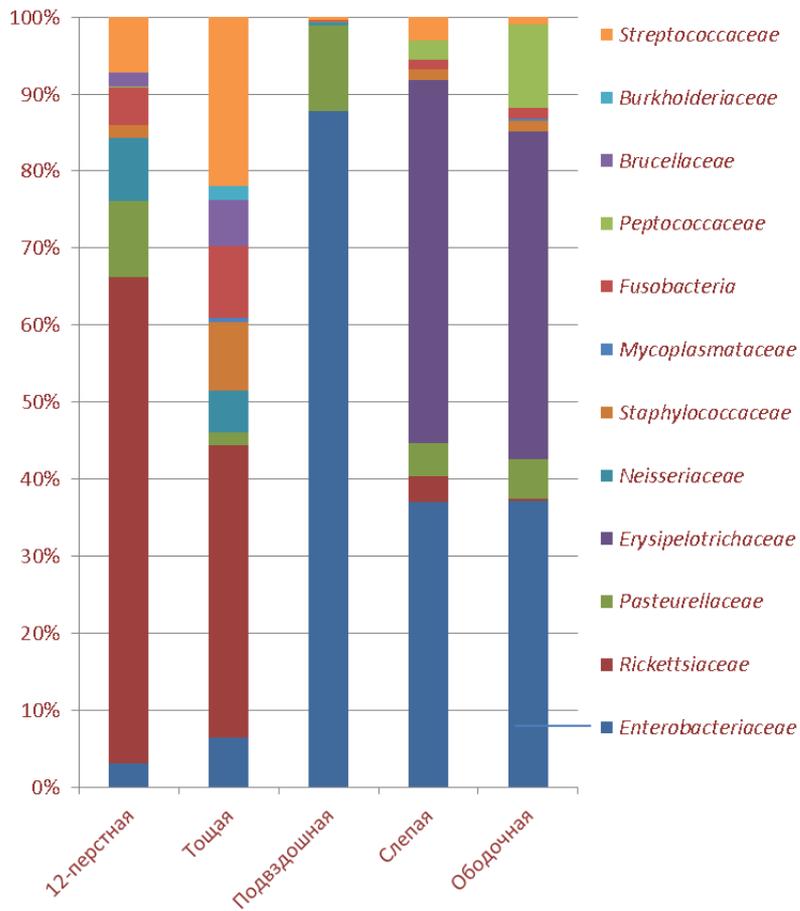
Bacillus alkalogaya
Bacillus aryabhatai
Bacillus axarquiensis
Bacillus djibeloensis
Bacillus ferrariarum
Bacillus herbersteinensis
Bacillus horneckiae
Bacillus litoralis
Bacillus malacitensis
Bacillus megaterium
Bacillus pseudofirmus
Bacillus subtilis
Bacillus thermoamylovorans

Функции бацилл в кишечнике свиней:

- ✓ антимикробная активность,
- ✓ иммуномодулирующая активность,
- ✓ протеолитическая активность,
- ✓ широкая ферментативная активность в отношении углеводов кормов.



Представленность патогенных и условно-патогенных бактерий в различных отделах кишечника свиней



Erysipelothrix inopinata **Возбудители**
Erysipelothrix muris **рожи**

Возбудители
гастроэнтеритов

Campylobacter canadensis
Campylobacter coli
Campylobacter gracilis
Campylobacter hyointestinalis
Campylobacter subantarcticus

Mycoplasma edwardii
Mycoplasma haemominutum **Возбудители**
Mycoplasma insons **микоплазмозов**
Mycoplasma suis

Возбудители
некробактериозов

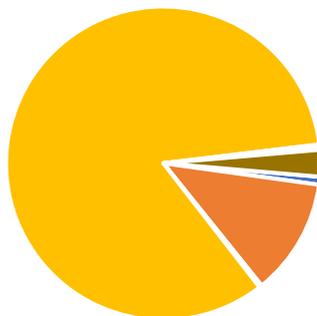
Fusobacterium naviforme
Fusobacterium nucleatum
Fusobacterium simiae

Staphylococcus aureus
Staphylococcus capitis
Staphylococcus chromogenes
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus equorum **Возбудители**
Staphylococcus haemolyticus **гнойно-**
Staphylococcus hominis **некротических**
Staphylococcus intermedius **инфекций**
Staphylococcus pasteurii
Staphylococcus pseudolugdunensis
Staphylococcus sciuri
Staphylococcus vitulinus
Staphylococcus xylosum



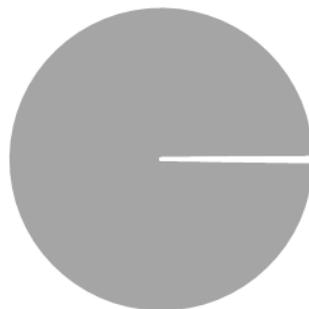
Представленность патогенов в толстой кишке свиней, возраст 149-153 дня (4 различных корпуса, 1 предприятие)

№1



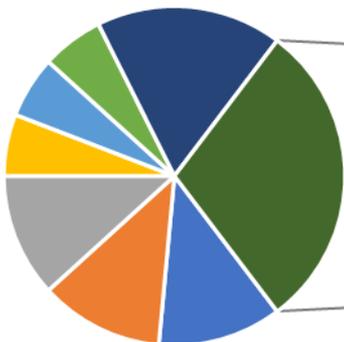
- Staphylococcus arlettae
- Enterococcus cecorum
- Streptococcus hyointestinalis
- Clostridium perfringens
- Clostridium histolyticum
- Fusobacterium sp.
- Actinobacillus sp.
- Acinetobacter johnsonii
- Acinetobacter tjernbergiae

№3



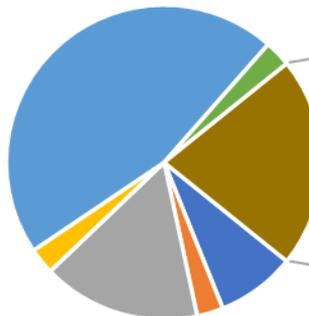
- Staphylococcus sp.
- Staphylococcus lentus
- Clostridium perfringens
- Actinobacillus minor
- Actinobacillus porcinus
- Acinetobacter albensis
- Psychrobacter sp.

№2



- Staphylococcus sp.
- Streptococcus sp.
- Clostridium perfringens
- Clostridium chauvoei
- Acinetobacter sp.
- Acinetobacter johnsonii
- Acinetobacter johnsonii
- Acinetobacter tjernbergiae
- Mycoplasma sp.
- Mycoplasma suis
- Mycoplasma suis
- Treponema bryantii

№4



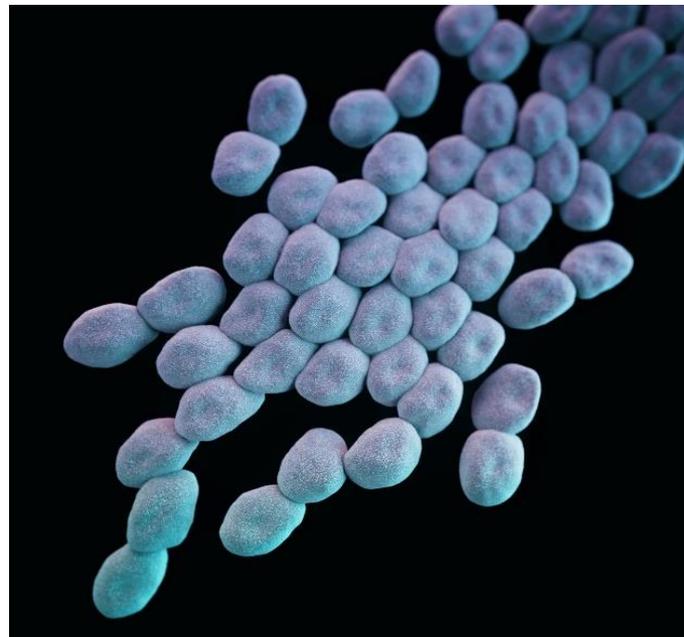
- Staphylococcus sp.
- Enterococcus faecium
- Streptococcus sp.
- Streptococcus sobrinus
- Clostridium perfringens
- Fusobacterium sp.
- Fusobacterium gastrosuis
- Haemophilus parainfluenzae
- Mycoplasma sp.



НОВЫЕ ПАТОГЕНЫ В СВИНОВОДСТВЕ – БАКТЕРИИ РОДА АСИНЕТОВАСТЕР



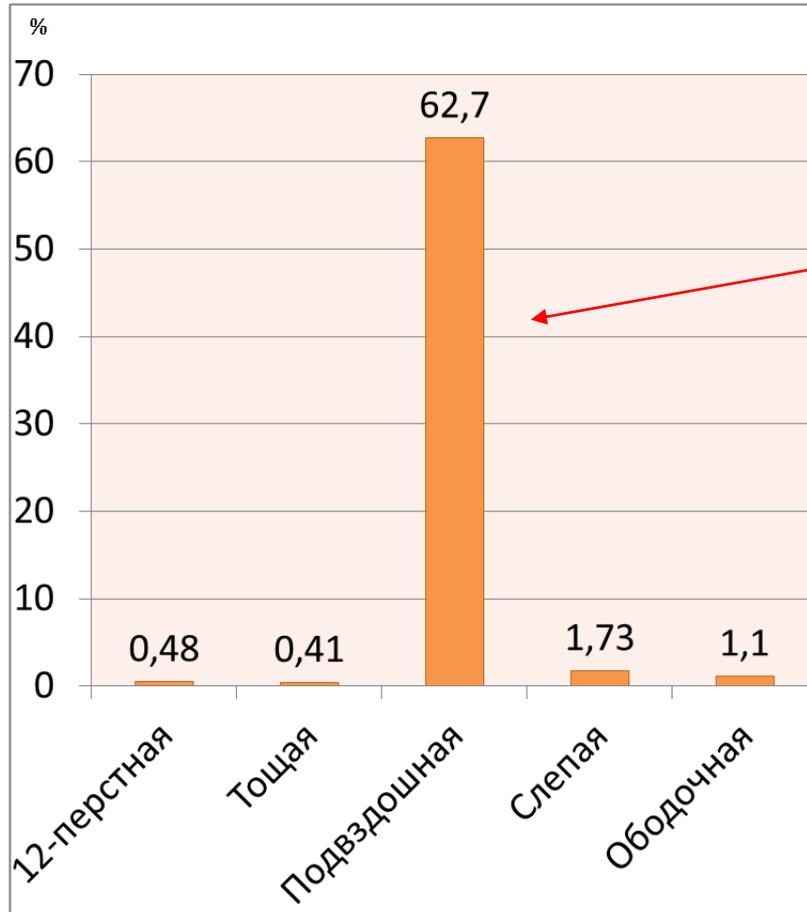
- **E**nterococcus sp.
- **S**taphylococcus aureus
- **K**lebsiella pneumoniae
- **A**cinetobacter baumannii
- **P**seudomonas aeruginosa
- **E**nterobacter sp.



Бактерии рода *Acinetobacter*
сканирующая электронная микроскопия



Энтеробактерии



Enterobacter aceae

Enterobacter hormaechei

Enterobacter nickellidurans

***Escherichia albertii* (>40%)**

Escherichia coli

Salmonella enterica

Serratia entomophila

Klebsiella granulomatis

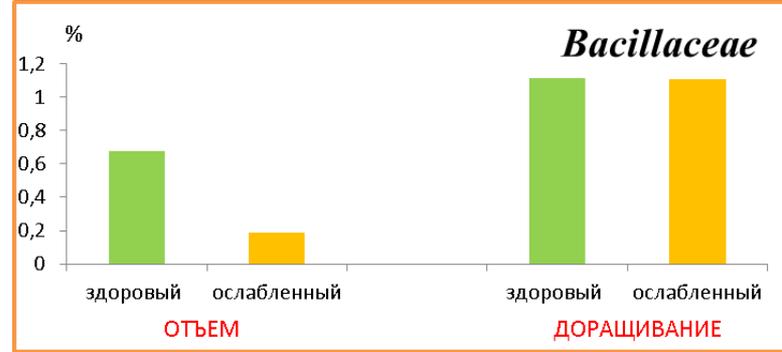
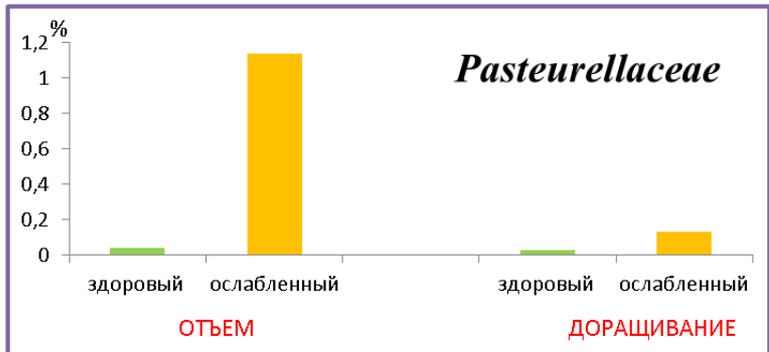
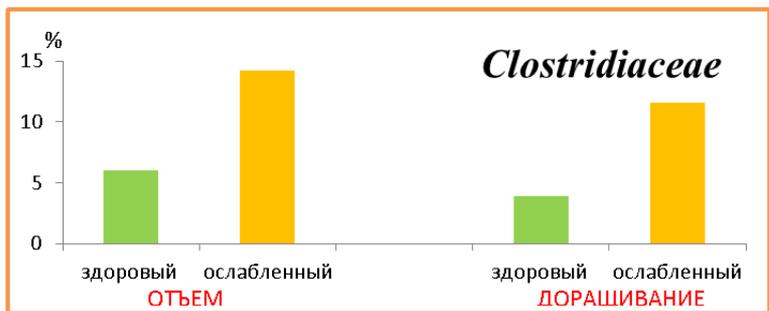
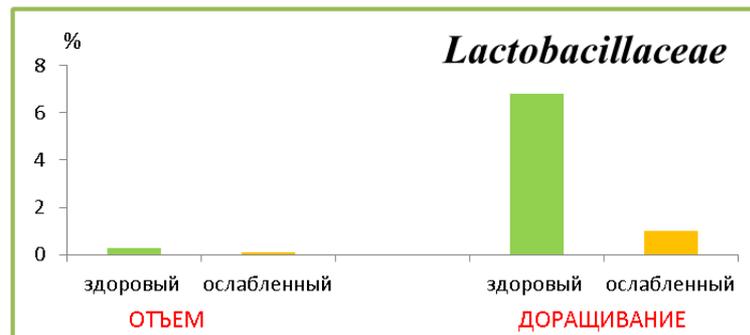
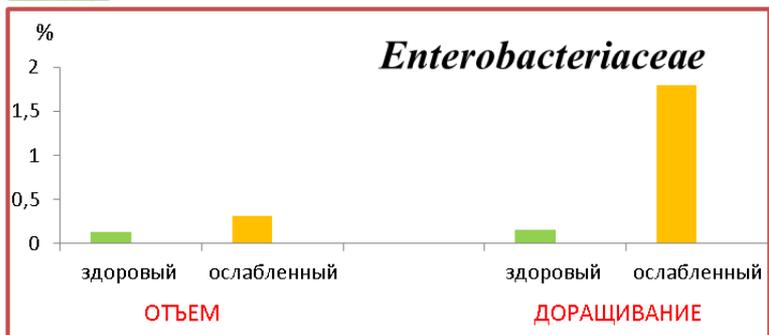
Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella variicola



Сравнительный анализ микробиома слепой кишки здоровых и ослабленных особей





Изменение содержания бактерий в толстом кишечнике поросят- отъемышей по сравнению с сосунами



Изменения кишечной микрофлоры у ослабленных отъемышей по сравнению с нормально развивающимися особями

Исчезали полезные виды:	Появлялись представители нежелательной микрофлоры:
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Campylobacter sp.</i>
<i>L. ultunensis</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
<i>L. antri</i>	<i>Erysipelothrix sp.</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Fusobacterium sp.</i>
<i>L. vaginalis</i>	



Причины нарушения микрофлоры ЖКТ свиней

Факторы, влияющие на изменение микробиоценозов

Чрезмерное
применение
дезинфицирующих
средств

Бактериальная
обсемененность
кормов

Применение
кормовых
антибиотиков

Смена рационов

Вакцинации

Стрессы



Результаты мониторинга содержания патогенов в кормах методом NGS-секвенирования

Патоген	Заболевание	Содержание: среднее-максимальное, клеток/г	Встречаемость, %
<i>Enterococcus cecorum</i>	Заболевания опорно-двигательного аппарата, энтериты	$1,8 \times 10^4 - 3,4 \times 10^4$	23
<i>Klebsiella</i> sp.	Клебсиеллез с разнообразной симптоматикой	$1,4 \times 10^4 - 3,3 \times 10^4$	31
<i>Pasteurellaceae</i>	Пастереллёз (геморрагическая септицемия)	$3,5 \times 10^4 - 4,4 \times 10^4$	62
<i>Yersinia</i> sp.	Кишечный иерсиниоз	$6,4 \times 10^4 - 1,9 \times 10^5$	85
<i>Legionella</i> sp.	Болезни органов дыхания	$6,2 \times 10^3 - 4,5 \times 10^4$	46
<i>Escherichia</i> sp.	Гастроэнтериты	$3,4 \times 10^5 - 7,7 \times 10^5$	100
<i>Staphylococcus</i> sp.	Инфекции сухожильно-связочного аппарата и суставов	$2,8 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$	100
<i>Streptococcus</i> sp.	Септицемии	$7,9 \times 10^4 - 1,3 \times 10^5$	77
<i>Campylobacter</i> sp.	Кампилобактериоз	$2,3 \times 10^3 - 1,9 \times 10^4$	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</i> sp.	Микоплазмоз – поражение органов дыхания	$1,9 \times 10^4 - 9,4 \times 10^4$	62
<i>Erysipelothrix</i> sp.	Рожистое воспаление у людей	$5,3 \times 10^2 - 5,8 \times 10^3$	8



Чем и как регулировать микрофлору? Антибиотики и пробиотики.

Что использовать для коррекции микрофлоры
ЖКТ свиньи?

АНТИБИОТИКИ

Уничтожение части кишечных микроорганизмов (в том числе и полезных) – перераспределение питательных в-в в пользу организма-хозяина, снижение риска заболеваний.



способствует возникновению антибиотико-резистентных штаммов; не обеспечивает колонизационную резистентность слизистых оболочек кишечника; оказывают губительное влияние не только на патогенные микроорганизмы, но и на состав нормофлоры кишечника

ПРОБИОТИКИ

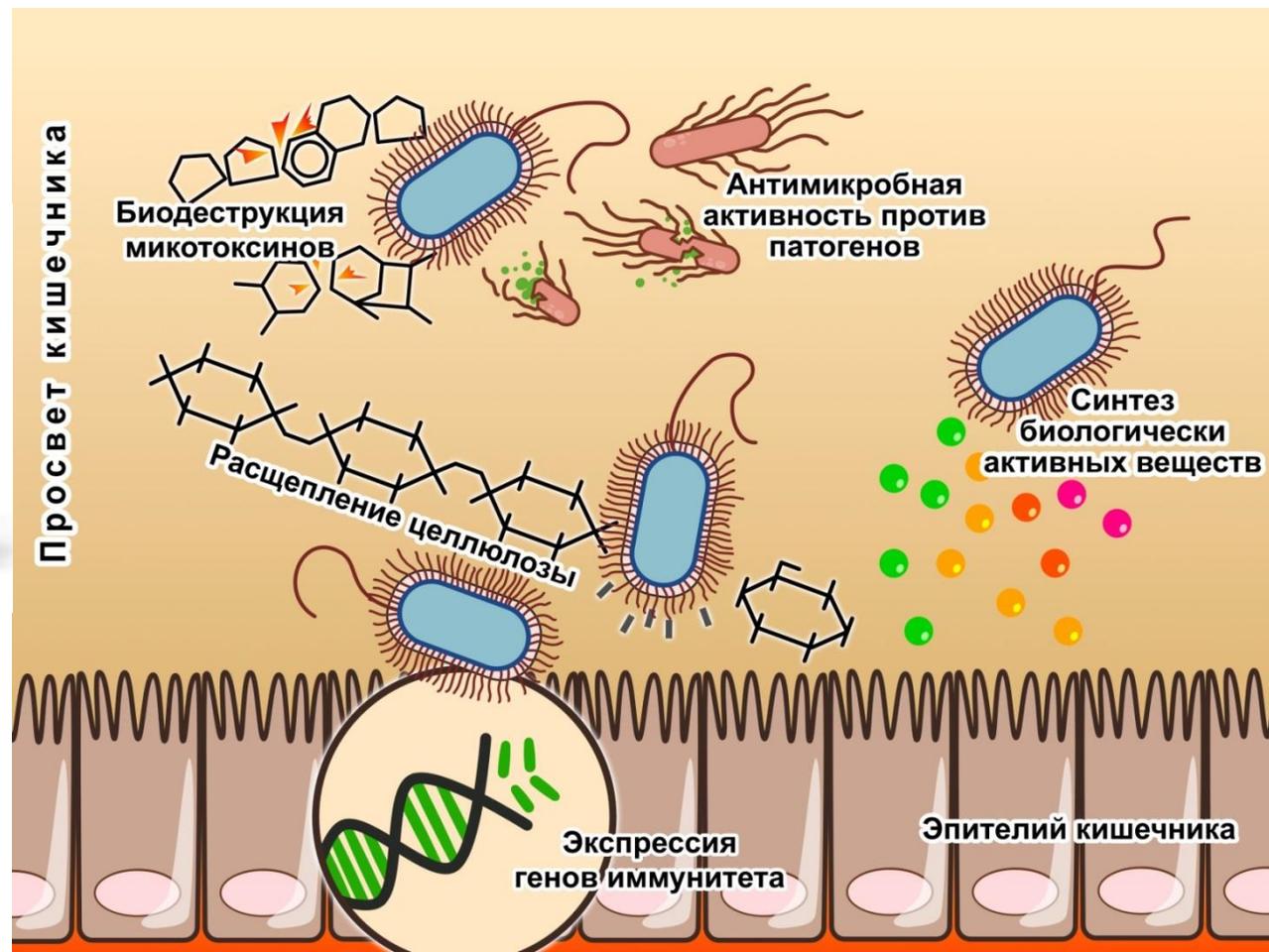
Адсорбция на кишечном эпителии, синтез органических кислот – вытеснение патогенной микрофлоры.



профилактика диареи; профилактика кормового стресса, стресса при транспортировке и вакцинации; восстановление микрофлоры кишечника; стимуляция роста и развития поросят



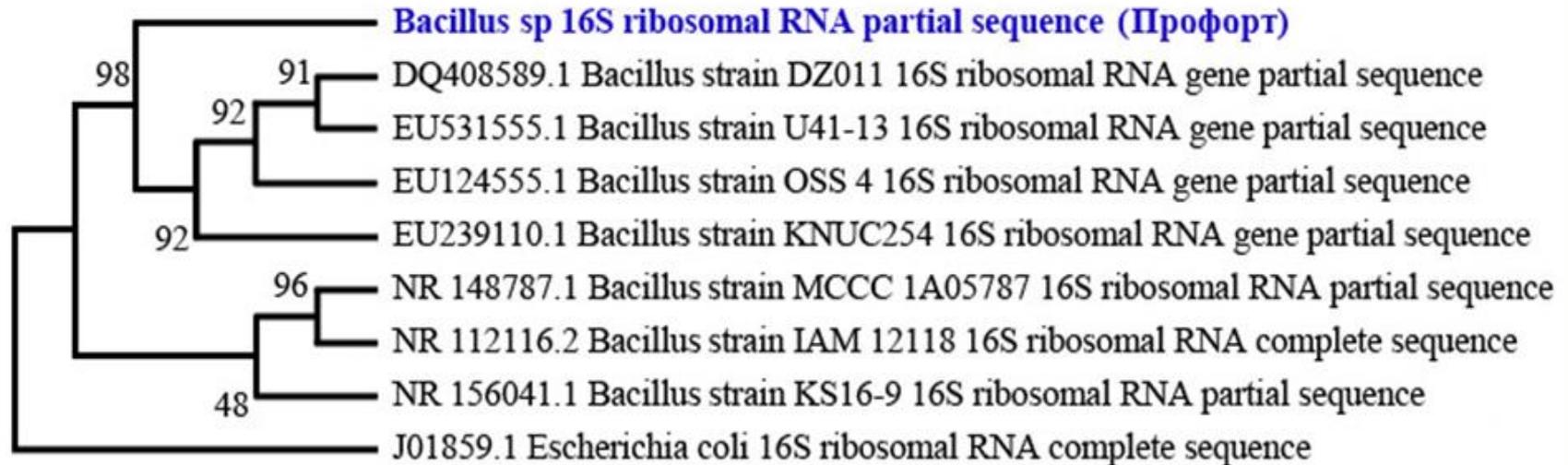
АНАЛИЗ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ





УНИКАЛЬНОСТЬ ШТАММОВ ДОКАЗАНА С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

- ✓ Высокий генетический потенциал штамма бактерии *Bacillus* sp. в составе пробиотика
- ✓ Это предопределило уникальность свойств



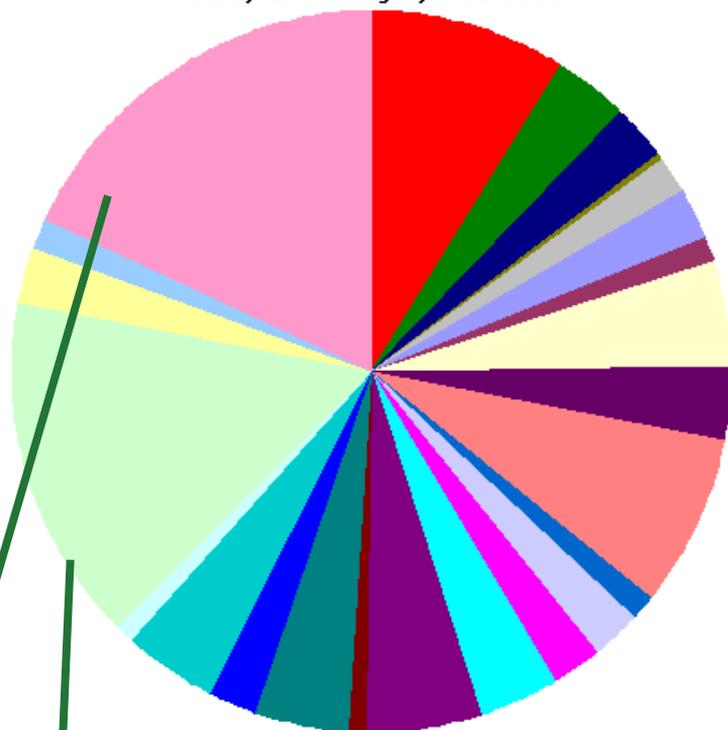


СЛОЖНЕЙШАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ СЕТЬ

Subsystem Coverage



Subsystem Category Distribution



Subsystem Feature Counts

- ☒ Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (340)
- ☒ Cell Wall and Capsule (123)
- ☒ Virulence, Disease and Defense (95)
- ☒ Potassium metabolism (13)
- ☒ Photosynthesis (0)
- ☒ Miscellaneous (60)
- ☒ Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids (5)
- ☒ Membrane Transport (86)
- ☒ Iron acquisition and metabolism (42)
- ☒ RNA Metabolism (179)
- ☒ Nucleosides and Nucleotides (129)
- ☒ Protein Metabolism (285)
- ☒ Cell Division and Cell Cycle (48)
- ☒ Motility and Chemotaxis (84)
- ☒ Regulation and Cell signaling (81)
- ☒ Secondary Metabolism (7)
- ☒ DNA Metabolism (140)
- ☒ Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (192)
- ☒ Nitrogen Metabolism (31)
- ☒ Dormancy and Sporulation (162)
- ☒ Respiration (78)
- ☒ Stress Response (163)
- ☒ Metabolism of Aromatic Compounds (24)
- ☒ Amino Acids and Derivatives (596)
- ☒ Sulfur Metabolism (91)
- ☒ Phosphorus Metabolism (53)
- ☒ Carbohydrates (661)

УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН

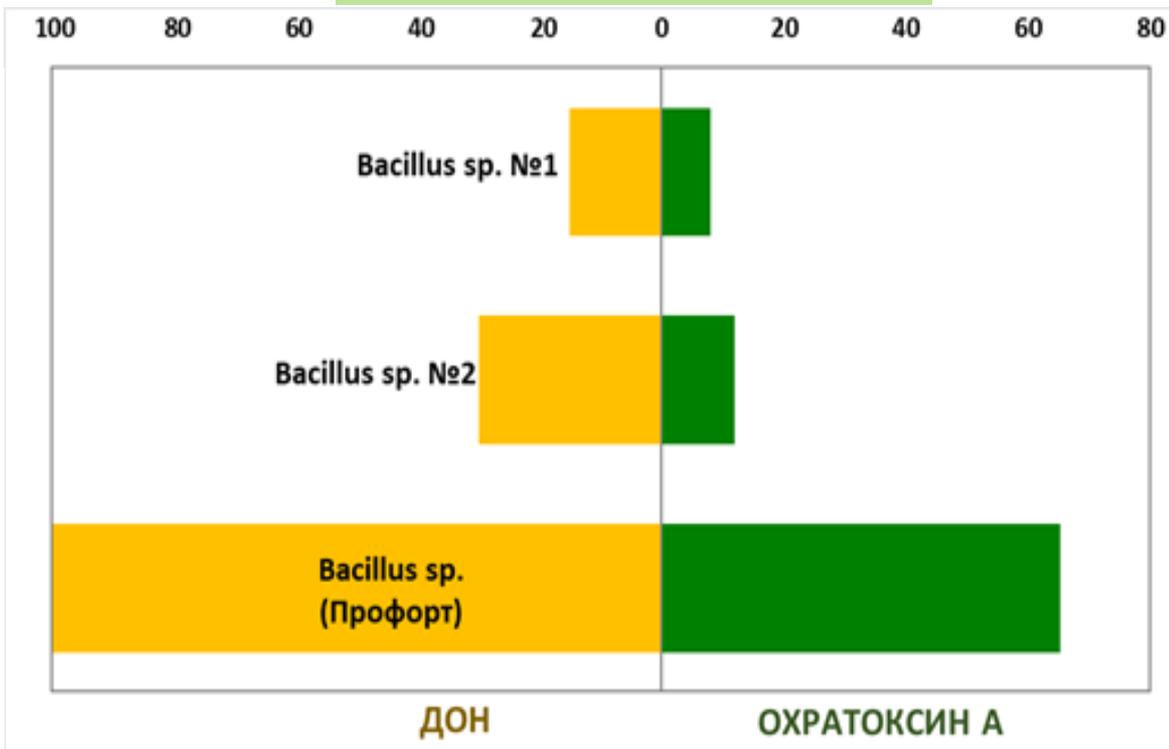
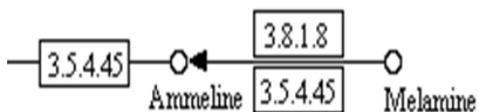
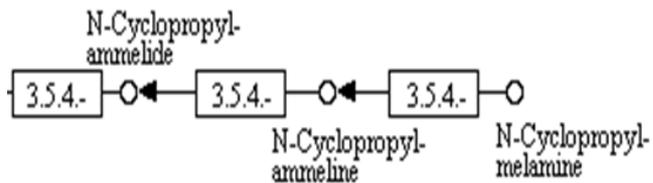
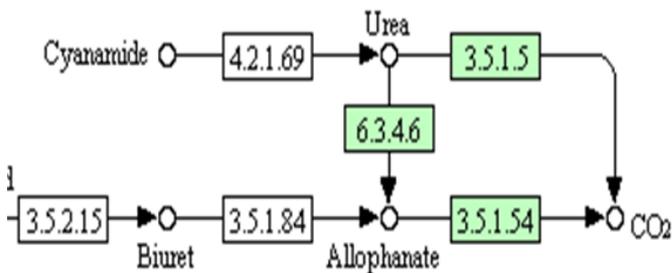
АМИНОКИСЛОТНЫЙ ОБМЕН



БИОДЕСТРУКЦИЯ ТОКСИНОВ

НА МОЛЕКУЛЯРНОМ
УРОВНЕ:

IN VITRO:



Уровень биодеструкции микотоксинов, %



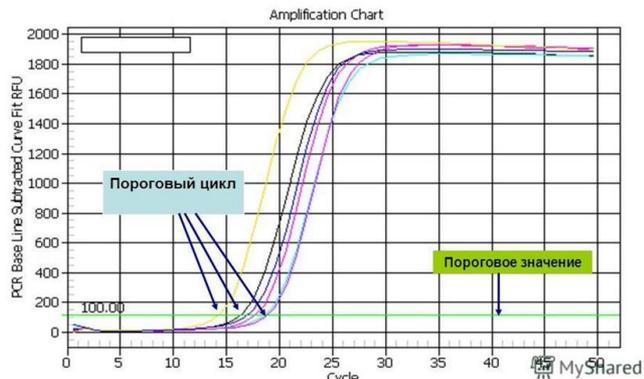
Метаболические пути штаммов бактерий *Bacillus megaterium* и *Enterococcus faecium* в составе пробиотика Профорт

<i>BACILLUS MEGATERIUM</i>		<i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>
1. СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ глицин триптофан серин валин треонин лейцин гистидин изолейцин фенилаланин	5. СИНТЕЗ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ янтарная фумаровая масляная	1. СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ: лизин метионин цистеин аргинин
2. СИНТЕЗ γ-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ	6. СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ рибофлавин ретинол фолиевая пантотеновая кислота кислота	2. ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ с антимикробными свойствами
3. СИНТЕЗ БАКТЕРИОЦИНОВ из группы ансамицинов	7. КОЛОНИЗАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ: био пленки защитные жгутики полисахариды	3. СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ биотин тиамин
4. СИНТЕЗ АНТИОКСИДАНТОВ глутатион		4. БИОДЕСТРУКЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ



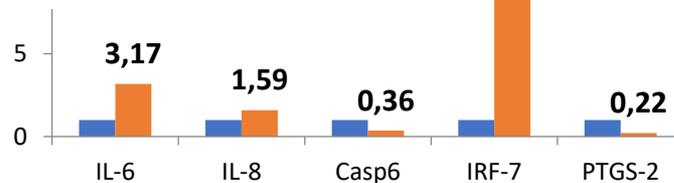
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИММУНИТЕТА

Ген	Действие
IL6, IL8	Противовоспалительные цитокины, сигнальные молекулы, привлекают дополнительных лейкоциты из кровотока к месту инфекции.
PTGS2	Ключевой фермент в биосинтезе простагландинов.
IRF7	IRF7 кодирует регуляторный фактор интерферона 7. Играет важную роль в активации транскрипции вирусноиндуцированных клеточных генов, в том числе генов интерферона типа I.
CASP6	Каспаза 6. Этот ген кодирует цистеиновые протеазы, которые играют важную роль в регуляции апоптоза.

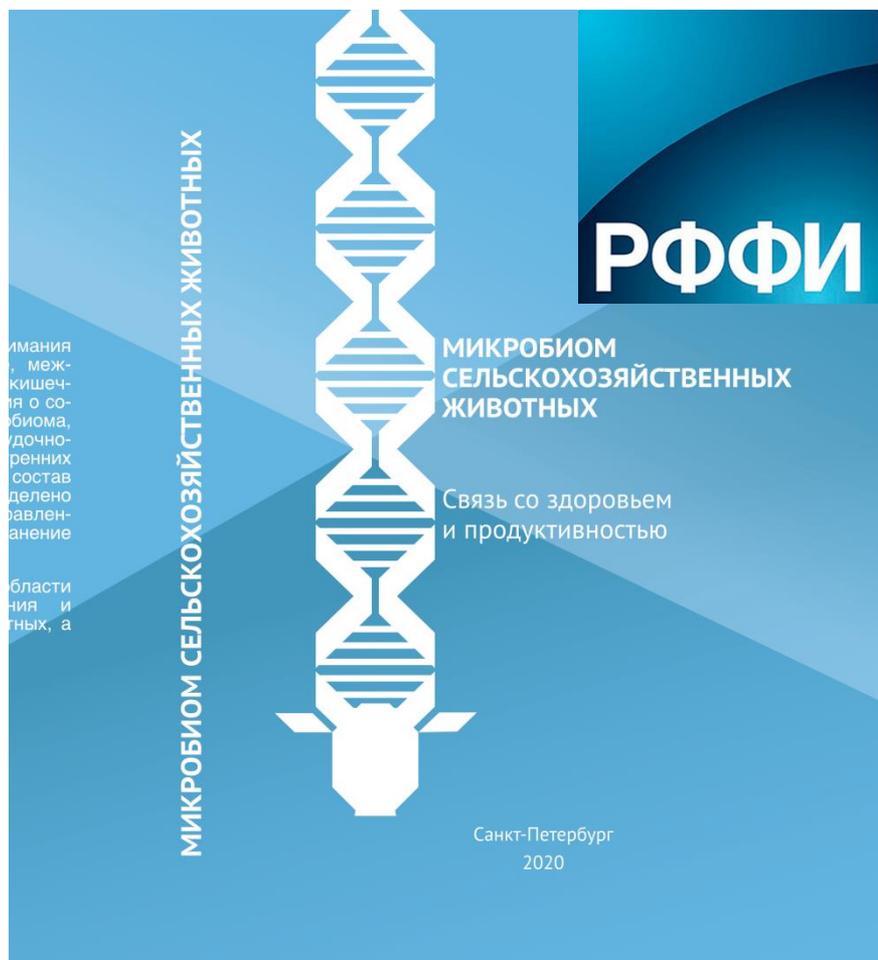


■ Контроль ■ Опыт

44,74



ВАЖНЫЙ ИТОГ:



Получен грант РФФИ №20-116-00001 на издание труда:
«Микробиом сельскохозяйственных животных: связь со здоровьем и продуктивностью»

Руководитель: Лаптев Г.Ю.

Издательство: ООО «Перспектив Науки»



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !

Ильина Лариса Александровна, 8-911-206-57-23
почта ilina@biotrof.ru сайт biotrof.ru

