

Дускаев Г.К.¹, Дроздова Е.А.², Алешина Е.С.², Безрядина А.С.²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства,
г. Оренбург, Россия

²Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, Россия
E-mail: forgetfulbird@yandex.ru

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КИШЕЧНУЮ МИКРОФЛОРУ ПТИЦЫ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИБИОТИЧЕСКИМ, ПРОБИОТИЧЕСКИМ И АНТИ-Quorum Sensing ЭФФЕКТАМИ

Поиски путей повышения продуктивности сельскохозяйственных животных всегда были одним из самых главных направлений исследований. Птицеводство не стало исключением. Изучение новых возможностей использования препаратов как синтетического, так и растительного происхождения, рассмотрение их состава и свойств, а так же исследование воздействий, оказываемых ими на кишечную микрофлору, позволит избежать возможных плачевных последствий, как для птицеводства, так и для человека. Вещества, такие как пробиотик Лактобифадол, антибиотик Биовит и экстракт коры дуба, в различных объемах оказывают как подавляющее, так и стимулирующее воздействие на кишечную микрофлору птицы.

Экстракт коры дуба оказал серьезное угнетающее действие на кишечную биоту птицы. Прослеживалась очевидная связь между увеличением объема экстракта и степенью подавления кишечной микрофлоры. Использование пробиотика Лактобифадол стимулировало количественный состав микрофлоры кишечника птицы, однако при совместном применении пробиотика с экстрактом коры дуба наблюдалось снижение численности микроорганизмов в изучаемом образце. Применение антибиотика Биовит способствовало серьезному угнетению кишечной микробиоты птицы. Но при изучении совместного действия препарата с экстрактом коры дуба происходила частичная инактивация оказываемых бактерицидных эффектов, о чем свидетельствуют более высокие значения колониеобразующих единиц (КОЕ), относительно одиночного использования антибиотика.

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, пробиотики, антибиотики, экстракт коры дуба, Quorum Sensing система бактериальных клеток.

Кишечная микрофлора птицы представляет собой совокупность множества бактериальных биоценозов. В ее состав входит более 400 видов микроорганизмов. Основными представителями микрофлоры кишечника цыплят являются бифидобактерии, лактобактерии и бактероиды, которые составляют примерно 90 процентов всей нормальной микрофлоры.

В ходе эволюции кишечная микрофлора разделилась на две различные группы. К первой, автохтонной относятся постоянные обитатели желудочно-кишечного тракта. Вторая группа микроорганизмов – аллохтонная или транзиторная, к которой относят условно-патогенные и патогенные микроорганизмы [1]. Состав и численность последней группы изменяется в зависимости от вида корма и воды [2]–[3]. Однако, баланс, наблюдаемый в здоровом организме, с многочисленными симбиотическими и конкурентными взаимоотношениями между автохтонной и зимогенной микрофлорой, может быть легко нарушен, что приводит к различным по степени тяжести патологическим состояниям [3]–[5]. Исключению

подобных состояний способствует применение кормовых добавок – антибиотиков, пробиотиков и многих других.

Следует отметить, что в случае бессистемного применения таких препаратов, как антибиотиков, например, в животноводстве и птицеводстве, эффективность их воздействия на организм значительно снижается. Это связано с тем, что патогенные и условно-патогенные микроорганизмы приобретают резистентность, а так же с возможным токсическим и аллергическим эффектом, оказываемым препаратом.

Перед современной наукой стоит вопрос поиска альтернативных способов контроля кишечной микрофлоры. Одним из вариантов является замена синтетических антибиотиков на органические, обладающие способностью образовывать «фитонциды» – биологически активные вещества с антибиотическим эффектом [6]–[7]. Количество публикаций посвященных антибактериальным свойствам соединений растительного происхождения на сегодняшний день серьезно возросло [8]–[11]. Одной из причин подобного интереса к веществам

растительного происхождения, как лекарственных препаратам, является поиск натуральных соединений, способных подавлять *Quorum Sensing (QS)* систему бактериальных патогенов. Известным примером подобного вещества является кора дуба [4]. Дубовая кора представляет собой природный продукт, который содержит не менее 8% дубильных веществ, галловую и эллановую кислоты и множество биологически активных веществ [12]–[15].

Согласно имеющимся данным, кора дуба демонстрирует наиболее выраженную и стабильную анти-QS активность, при отсутствии в ее составе очевидных антибактериальных веществ. В экстракте коры дуба были определены 7 компонентов с анти-QS активностью [16]–[17].

Целью исследования являлось изучение совместного влияния экстракта коры дуба с пробиотиком Лактобифадол и антибиотиком Биовит на количественный состав кишечной микрофлоры птицы.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ФГБНУ ВНИИМС на 7 группах бройлеров. Контрольная группа (К) исследуемых птиц получала только основной рацион, при кормлении опытных групп помимо общего корма в рацион включались вещества, обладающие антибиотическим, пробиотическим и анти-*Quorum sensing* эффектами: О1, О2 – экстракт коры дуба в концентрации 0,2 и 0,4 мл/гол/сут соответственно; О3 – пробиотик Лактобифадол в концентрации 0,2 г/1 кг ж.м.; О4 – препараты Лактобифадол и экстракт коры дуба в концентрации, соответствующей группе О1; О5 – ан-

тибиотик Биовит в концентрации 0,6 г/1 кг ж.м.; О6 – антибиотик Биовит и экстракт коры дуба в концентрации в концентрации 0,2 мл/гол/сут.

После уоя содержимое полости тонкого кишечника помещалось в пластмассовую пробирку типа эппендорф. Посев производился на следующий день после уоя, до этого образцы содержались в морозильной камере (–20°C). Точную навеску 5 мг каждого из исследуемых образцов разводили в 5 мл стерильного 0,9% физиологического раствора. Полученную суспензию в объеме 200 мкл переносили на поверхность питательных сред мясо-пептонный агар (МПА) и Эндо (произведены ФБУН «ГНЦ ПМБ», РФ). Посев осуществлялся микробиологическим шпателем с последующей инкубацией культуры при 37 °С в течение 24 ч. По истечении времени культивирования был произведен подсчет КОЕ на чашках Петри. Эксперимент выполнен в трех повторностях и обработан методами статистического анализа.

Результаты

При выращивании содержимого кишечника экспериментальных животных на МПА в контрольной группе начитывалось 441 КОЕ (рис. 1). Добавление же в корм экстракта коры дуба привело к снижению численности кишечной микрофлоры (рис. 1а). При этом наблюдалась зависимость, связанная с увеличением объема действующего агента, приводящая к дозозависимому бактерицидному эффекту. Так, процентное соотношение колоний составляет 75 и 18% от контрольного значения в группах О1 и О2 соответственно. На наш взгляд подобный результат связан с анти-QS эффектом экстракта коры дуба, который заключается в

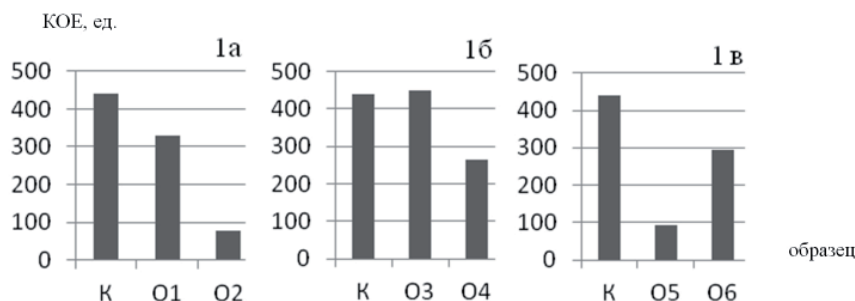


Рисунок 1 – Количество КОЕ, полученных после посева исследуемых образцов кишечной микрофлоры птицы на питательную среду МПА

ингибировании сигнальных рецепторов ацил-гомосеринлактонов.

При включении в рацион птиц пробиотика Лактобифадол (рис. 1б) наблюдалось несущественное повышение количественного состава кишечной микрофлоры и количество КОЕ на чашках Петри в группе ОЗ составляет 102% от выросших в контрольном образце. При комплексном воздействии пробиотика и экстракта коры дуба в группе О4 прослеживается угнетение численности бактерий на 40% от наблюдаемых в контроле. По нашему мнению, подобный результат также связан с анти-QS эффектом экстракта коры дуба, который усиливается при поступлении в кишечник дополнительных пробиотических бактерий.

Включение антибиотика Биовит, действующим началом которого является хлортетрациклин, в корм животных привело к подавлению кишечной микрофлоры, и количество колоний, выросших на МПА (рис. 1в), составило 21% от значения в контрольном образце. Так как антибиотик Биовит подавляет синтез белка в микробной клетке у грамотрицательных микроорганизмов, можно предположить, что выросшие после его использования бактерии относятся к грамположительным микроорганизмам, населяющим тонкий кишечник птиц. Однако, при совместном применении антибиотика с экстрактом коры дуба, нами не наблюдалось аддитивного угнетения микрофлоры и количество выросших колоний в процентном отношении составило 48% от контроля, что более чем в два раза превышает значения, полученные без использования данного экстракта.

Второй средой, использованной нами для детекции результатов посева образцов со-

держимого тонкого кишечника птицы, была дифференциально-диагностическая среда Эндо (рис. 2). Количество выросших на ней колоний составило 133 единицы, (30% от общего числа выделенных на МПА микроорганизмов). Этот факт позволил предположить, что выросшие микроорганизмы – представители семейства *Enterobacteriae*.

Экстракт коры дуба в группах О1 и О2, аналогично с эффектом, полученным на питательной среде МПА, подавил численность микрофлоры кишечника исследуемых птиц (рис. 2а). Также, внесение двойного объема экстракта, приводит к более сильному подавлению численности кишечной микрофлоры: 79 и 59% от контроля соответственно.

Пробиотик Лактобифадол (рис. 2б), оказал значительное стимулирующее действие на микробиоту кишечника. Количество колоний, выросших в группе О3, составило 322, что соответствует 242% от контроля. При совместном же применении пробиотического препарата и экстракта коры дуба в группе О4, наблюдалось повышение численности колоний до 215% от контрольного образца, что связано с угнетающим эффектом экстракта.

Антибиотик Биовит оказал существенное подавляющее действие на кишечную микрофлору птицы (рис. 2в). После его воздействия, процент КОЕ в группе О5 составил 13% от контроля. Однако, при аддитивном применении препарата с экстрактом коры дуба в группе О6, произошла частичная инактивация антибактериальных свойств и КОЕ составляли 75% от контроля.

Полученные нами данные свидетельствуют о значительном анти-QS эффекте экстракта

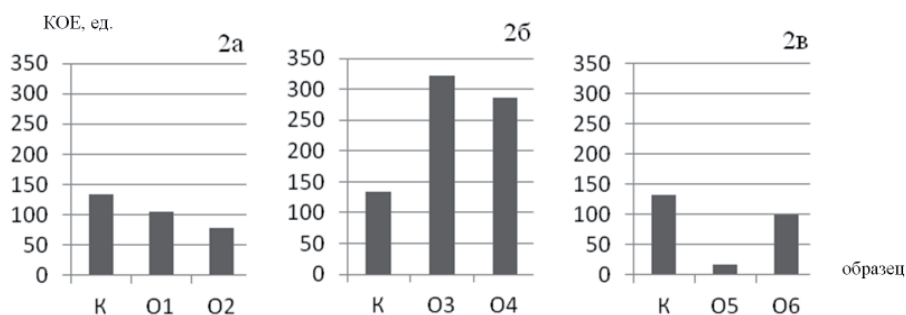


Рисунок 2 – Количество КОЕ полученное после посева содержимого кишечника птицы на питательную среду Эндо

коры дуба и могут быть полезными в области у бактерий как ключевого механизма индукции разработки методов контроля бактериальных их патогенного потенциала. инфекций, направленных на ингибирование QS

11.09.2017

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-16-10048) на базе Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства (ВНИИМС)

Список литературы:

1. Закирова В.Б. Микробиоценоз кишечника цыплят [Электронный ресурс] // Студенческий научный форум. – Красноярск, 2013. – Режим доступа :<http://www.scienceforum.ru/2013/pdf/7247.pdf>
2. Павлова Н. Значение нормальной микрофлоры пищеварительного тракта птиц для их организма [Электронный ресурс] // отраслевой портал webPticeProm. – Режим доступа :<http://webpticeprom.ru/ru/articles-veterinary.html?pageID=1347513023> – 13.09.2012.
3. Ivanov, I.E. A balancing act optimising the gut microflora / I.E. Ivanov // Poultry International. 2003. – no 6. -pp.33-37.
4. Collins, M.D. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. / M.D. Collins, G.R. Gibson // Am.J.Clin.Nutr. 1999, V 69 (5). pp 1052-1057.
5. Лыско С.Б., Влияние пробиотиков на патогенную микрофлору желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров / Материали V Міжнародної конференції «Птахівництво-2009» – 2009. –№ 62. – С. 109-111
6. Казачкова Н.М., Альтернатива антибиотикотерапии в животноводстве – применение лекарственных растений / Н.М. Казачкова, С.Р. Ишбулатова, Г. К. Дускаев // Biologicalsciences –2017. – №4 –С. 266-268.
7. Токин, Б.П. Фитонциды. 2 изд. / Б.П. Токин – М.: Изд-во АМН СССР, 1951. – 238 с.
8. Koh, K.H. Screening of traditional Chinese medical plants for quorum-sensing inhibitors activity / K.H. Koh, F.-Y. Tham // J of Microbiology, Immunology and Infection. 2011. V. 44. pp. 144-148.
9. Ponnusamy, K. Inhibition of quorum sensing mechanism and Aeromonas hydro-philabiofilm formation by Vanillin / K. Ponnusamy, D. Paul, J.H. Kweon // En-viron. Eng. Sci. 2009. V. 26 (8). pp. 1359-1363.
10. Truchado, P. Inhibition of quorum sensing (QS) in Yersinia enterocolitica by an Orange extract rich in glycosylated flavanones / P. Truchado, J.-A. Gimenez-Bastida, M. Larrosa, . Castro-Ibanez, J.C. Espin, F.A. Tomas-Barberan, M.T. GarciaConesa, A. Allende // J Agric. Food Chem. 2012. V. 60 (36). pp. 8885-8894.
11. Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. Veterinarni Medicina. 2010; V 55 (5). pp 199–224.
12. Atkinson, S., Sockett, R. E., Camara, M., Williams, P. Quorum sensing and the lifestyle of Yersinia II Curr Issues Mol Biol. 2006. V. 8, no 1. pp. 1-10.
13. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria / Ann. Rev. Microbiol. 2001.V 55. pp 165-199.
14. Lyon G.J., Novick R.P. Peptide signaling in Staphylococcus aureus and other gram-positive bacteria // Peptides. 2004. V 25. pp 1389-1403.
15. Schauder, S., Bassler, B. L. The languages of bacteria // Genes Dev. 2001.V. 15, no 12. pp. 1468-1480.
16. Толмачева А.А. Лекарственные растения и их компоненты как ингибиторы системы Quorum Sensing первого типа у бактерий дис. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2015. 129 с.
17. Дускаев Г.К. Разработка новых решений по управлению чувством кворума микробиома сельскохозяйственных животных и птицы /Г.К. Дускаев, Н.М. Казачкова, А.С. Ушаков // Инновационные направления и разработки для эффективного сельскохозяйственного производства – 2016. –№ 1 – С 163- 165

Сведения об авторах:

Дускаев Галимжан Калиханович, заведующий отделом кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. профессора С. Г. Леушина Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства, доктор биологических наук
e-mail: [gduskaev@mail.ru](mailto:gduaev@mail.ru)

Дроздова Елена Александровна, доцент кафедры биохимии и микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: drozdova15@mail.ru

Алешина Елена Сергеевна, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: esaleshina@mail.ru

Безрядина Анна Сергеевна, бакалавр 4 курса кафедры биохимии и микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: forgetfulbird@yandex.ru