

Микробиом и продуктивность

УДК 636.52/.58:591.3:579.64

doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.883rus

**ИЗМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА  
В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ\*****В.И. ФИСИНИН<sup>1</sup>, Г.Ю. ЛАПТЕВ<sup>2</sup>, И.Н. НИКОНОВ<sup>2</sup>, Л.А. ИЛЬИНА<sup>2</sup>,  
Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ<sup>2</sup>, В.А. ФИЛИППОВА<sup>2</sup>, Н.И. НОВИКОВА<sup>2</sup>, А.А. ГРОЗИНА<sup>1</sup>,  
Т.А. ЕГОРОВА<sup>1</sup>, Т.Н. ЛЕНКОВА<sup>1</sup>, В.А. МАНУКЯН<sup>1</sup>, И.А. ЕГОРОВ<sup>1</sup>**

Известно, что микроорганизмы, населяющие желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), участвуют в обеспечении сельскохозяйственной птицы питательными веществами, антибиотиками, гормонами, витаминами. В связи с этим актуально изучение изменений микробиоценоза ЖКТ в процессе онтогенеза. Важность исследований обусловлена воздействием экологического соотношения между облигатными видами микроорганизмов пищеварительного тракта в течение жизни на метаболические процессы, состояние здоровья и продуктивность. Интересным и дискуссионным в настоящее время остается также вопрос о составе микроорганизмов в кишечнике куриных эмбрионов, поскольку публикуемые исследования весьма немногочисленны. Несмотря на то, что традиционно кишечник эмбрионов птиц считается стерильным, в ряде работ показана способность микроорганизмов колонизировать ЖКТ птиц на стадии эмбрионального развития. С использованием молекулярно-генетического метода T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) мы провели сравнение бактериального сообщества содержимого ЖКТ от 6- и 17-суточных куриных эмбрионов и 26-, 150- и 300-суточных кур-несушек кросса Хайсекс Уайт (ви-варий ФГУП Загорское ЭПХ ВНИТИП, Московская обл.). В отличие от классических представлений, было показано наличие в ЖКТ куриных эмбрионов богатого таксономического разнообразия бактерий, доминирующими среди которых оказались типичные для птиц представители кишечной микрофлоры семейства *Enterobacteriaceae* (преимущественно *Escherichia coli*). Также мы обнаружили представителей класса *Clostridia* (семейств *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* и др.), филума *Bacteroidetes*, порядков *Negativicutes*, *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, которых выявляли ранее у вылупившихся цыплят и взрослых птиц. Интересно отметить присутствие возбудителей опасных заболеваний животных — бактерий родов *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, порядка *Rickettsiales*. При этом структура микробиоценоза содержимого ЖКТ эмбрионов кур на 6-е сут инкубации характеризовалась более высоким таксономическим разнообразием, чем на 16-е сут (число фило-типов соответственно  $75 \pm 2,75$  и  $30 \pm 1,20$ ). В онтогенеза в ЖКТ птицы наблюдалось развитие бактериального сообщества, в составе микробиома появлялись новые микроорганизмы. Разнообразие выявляемых у 26-суточных цыплят, а также 150- и 300-суточной птицы бактерий было шире по сравнению с таковым у эмбрионаов — свыше  $175 \pm 8,12$  фило-типа. При этом по сравнению с 26- и 150-суточной птицей у 300-суточных кур-несушек общее разнообразие бактерий и содержание неидентифицированных фило-типов оказались наименьшими. У взрослой птицы по сравнению с эмбрионами наблюдали изменение доминирующих групп микроорганизмов: большее содержание представителей класса *Clostridia*, класса *Negativicutes* и меньшее — классов *Bacillales*, *Bifidobacteriales*. Выявленное расширение таксономического разнообразия микроорганизмов у птицы по сравнению с эмбрионами свидетельствует о заселении ЖКТ кур микроорганизмами, включая представителей порядка *Lactobacilales*, а также патогенов — родов *Listeria*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Mycoplasma*, *Acinetobacter*, семейств *Pasteurellaceae*, *Campylobacteraceae*, филума *Fusobacteria*. Основываясь на полученных результатах, можно говорить о становлении микробиоэкологической системы птиц (содержимое ЖКТ в совокупности с населяющей его микрофлорой) уже на стадии эмбрионального развития. При этом микроорганизмы, присутствующие в ЖКТ эмбриона, служат основой, которая определяет формирование стартового кишечного биоценоза у вылупившихся цыплят и взрослых особей.

**Ключевые слова:** микрофлора кишечника, слепые отростки, онтогенез, куриный эмбрион, куры-несушки, молекулярно-генетические методы, T-RFLP-анализ.

Микрофлора, населяющая желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), обеспечивает организм хозяина питательными веществами (за счет использования собственных целлюлозолитических и амилолитических ферментов, полностью отсутствующих у сельскохозяйственной птицы), а также вита-

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

минами, антибиотиками, белками, гормонами и другими соединениями, вовлекаемыми в метаболизм (1-4). Согласно классическим представлениям, микробиоценоз пищеварительной системы эмбрионов стерилен, а его заселение микроорганизмами происходит после вылупления цыпленка (5-7). К бактериям, населяющим кишечник птицы, традиционно относят бифидобактерии, стрептококки, лактобактерии, лактат-ферментирующие бактерии, эубактерии, бактериоиды и энтеробактерии (1, 8, 9).

Бактериальное сообщество пищеварительного тракта в течение жизни птицы претерпевает последовательные изменения, связанные с рядом факторов, основные из которых — рост и развитие кишечного тракта, режим кормления и состав корма. При этом микроорганизмы кишечника выступают в качестве высокочувствительной индикаторной системы. Стоит отметить, что изменение экологического соотношения между облигатными видами микроорганизмов пищеварительного тракта не всегда оказывает положительное воздействие на метаболические процессы и состояние здоровья птицы (10). В связи с этим актуально изучение качественного и количественного состава микробиоты ЖКТ в онтогенезе.

До 1990-х годов исследования микроорганизмов в разных экосистемах были ограничены изучением культивируемых штаммов на искусственных питательных средах. Существенно расширить понимание состава микробиоты позволило развитие метагеномных методов, важной особенностью которых можно считать отсутствие необходимости в культивировании микроорганизмов (11, 12). Это обстоятельство имеет принципиальное значение, поскольку до 99 % микроорганизмов биосферы не поддаются культивированию на искусственных питательных средах, но при этом могут играть важную экологическую роль (7). Сведений о составе микробиома ЖКТ куриных эмбрионов, полученных с помощью метагеномного анализа, в доступной литературе мы не обнаружили.

Используя молекулярно-генетический метод T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), мы впервые проанализировали состав бактериального сообщества ЖКТ кур в онтогенезе — от эмбриона до взрослой птицы. Был продемонстрирован широкий таксономический состав бактерий содержимого кишечника эмбрионов, включающий представителей условно-патогенной микрофлоры, патогенов, некультивируемых микроорганизмов.

Цель работы — исследование сукцессии в бактериальном сообществе желудочно-кишечного тракта птицы в онтогенезе с использованием метода T-RFLP.

*Методика.* Отбирали по 3 пробы содержимого ЖКТ от 6- и 16-суточных куриных эмбрионов и по 3 пробы из слепых отростков кишечника 26-, 150- и 300-суточных кур-несушек кросса Хайсекс Уайт (инкубаторий Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства — ВНИТИП, виварий ФГУП Загорское ЭПХ ВНИТИП, Московская обл.). Кормление птицы осуществляли вручную вволю сухими полнорационными комбикормами в соответствии с нормами для кросса. Птицу содержали в клеточных батареях («Big Dutchman», Германия) по 35 гол. в группе (без разделения по полу) с соблюдением всех технологических параметров, соответствующих нормам ВНИТИП. Отбор проб и подготовку образцов проводили со строгим соблюдением стерильности в соответствии с установленными требованиями (13).

Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. Для исследования состава бактериального сообщества

применяли T-RFLP-анализ. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США), используя зубактериальные праймеры 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце (флуорофор WellRed D4, «Beckman Coulter», США) и 1492R (TACGGHTA-CCTTGTTACGACTT). Флуоресцентно меченные ампликоны гена 16S-rРНК очищали по стандартной методике (14). Полученные ампликоны (30-50 нг) обрабатывали эндонуклеазами HaeIII, HhaI и MspI в соответствии с рекомендациями изготовителя («Fermentas», Литва). Рестрикты анализировали на секвенаторе SEQ 8000 («Beckman Coulter», США). Принадлежность бактерий к филогенетическим группам определяли в программе Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

**Результаты.** Традиционно считается, что у птиц ЖКТ эмбрионов стерилен (1, 15, 16), а формирование микробиоценоза пищеварительной системы птенцов происходит после вылупления в результате контакта с окружающей средой (5-7). Однако имеются публикации, авторы которых с использованием классических микробиологических методов (17, 18), а также ПЦР в реальном времени (19) продемонстрировали, что микроорганизмы способны колонизировать ЖКТ птиц внутри яйца на стадии эмбрионального развития.

Применив T-RFLP-анализ, мы установили, что бактериальное сообщество ЖКТ эмбрионов характеризовалось значительным таксономическим разнообразием (табл.). В структуре микробиоценоза содержимого ЖКТ эмбрионов кур на 6-е сут инкубации было обнаружено значительно большее биоразнообразие микроорганизмов, чем на 16-е сут. Доминировали типичные для кишечной микрофлоры птиц представители семейства *Enterobacteriaceae*, среди которых основную долю составляли бактерии, относящиеся к виду *Escherichia coli*. Интересно, что их количество оказалось в 2 раза больше у 16-суточных эмбрионов ( $46,90 \pm 1,87$  %), чем у 6-суточных ( $21,30 \pm 1,03$  %). Среди индигенной микрофлоры ЖКТ у эмбрионов также выявлялись ранее обнаруженные у вылупившихся цыплят и взрослых птиц (20) представители класса *Clostridia* (семейства *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* и др.), филума *Bacteroidetes*, порядков *Negativicutes*, *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*. Амило- и протеолитические бактерии порядка *Actinomycetales*, целлюлозолитические микроорганизмы класса *Clostridia*, филума *Bacteroidetes*, обитая в ЖКТ вылупившихся цыплят и взрослых птиц, играют значительную роль в процессах метаболизма, активно участвуя в ферментации протеина, крахмала и полисахаридов кормов.

Микроорганизмы порядка *Bifidobacteriales*, продуцируя в ЖКТ птиц органические кислоты и бактериоцины, обеспечивают колонизационную резистентность микробиотопа в отношении патогенной микрофлоры, а также синтезируют эссенциальные нутриенты (1). Мы наблюдали 130-кратное увеличение содержания бифидобактерий в кишечнике у эмбрионов на протяжении инкубации.

Интересно, что в метагеномном сообществе ЖКТ 16-суточных эмбрионов отсутствовали типичные представители автохтонной симбиотической кишечной микрофлоры птиц — факультативно-анаэробные бактерии порядка *Lactobacillales*, тогда как в ЖКТ 6-суточных эмбрионов кур доля этих микроорганизмов оказалась высокой ( $10,11 \pm 0,42$  %). Обладая активной способностью к кислотообразованию, большинство бактерий порядка *Lactobacillales* выполняют функцию конкурентного вытеснения патогенной

микрофлоры в ЖКТ у вылупившихся цыплят и взрослых птиц (1). Внутри порядка *Lactobacillales* на микроорганизмы рода *Lactobacillus* приходилось  $9,30 \pm 0,39$  %, *Pediococcus* —  $0,66 \pm 0,02$  % и *Trichococcus* —  $0,15 \pm 0,006$  %. В ЖКТ эмбрионов обнаружили высокий процент представителей порядка *Bacillales*, преимущественно бактерий рода *Bacillus*. Подавляющее их число способно к колонизации пищеварительного тракта птицы, синтезу органических кислот, бактериоцинов, антибиотических веществ и ферментов, активному участию в процессах метаболизма различных питательных субстратов (18, 19). Кроме того, в ЖКТ присутствовало некоторое количество генотипов неидентифицированных бактерий.

В метагеномном сообществе кишечника у 6-суточных эмбрионов были обнаружены патогенные и условно-патогенные бактерии — возбудители опасных заболеваний животных из родов *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, порядка *Rickettsiales* и др. (табл. 1), а на 16-е сут инкубации наблюдалось заселение ЖКТ новыми патогенными микроорганизмами родов *Staphylococcus*, *Morganella*, *Bordetella*, которые, вероятно, проникали через поры в оболочке яйца.

Необходимо отметить, что бактерии *E. coli* и родов *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, выявленные нами в ЖКТ эмбрионов во время инкубации, способны вызывать опасное заболевание омфалит (пупочно-желточная инфекция) — основную причину смертности цыплят в период от вылупления до 14-х сут жизни (21). Микроорганизмы рода *Bordetella* — возбудители заболеваний респираторного тракта птицы, в основном цыплят раннего возраста (22). Бактерии порядка *Rickettsiales* относятся к патогенам, переносчиками которых служат представители типа *Arthropoda*. Вероятно, возникновение описанных заболеваний связано с неблагоприятным составом микрофлоры ЖКТ — увеличением численности упомянутых патогенов на стадии эмбрионального развития птицы.

Результаты, полученные нами с применением метода T-RFLP, совпадают с данными Z. Babasa (18). Используя классические микробиологические методы, автор изучил около 3000 проб содержимого кишечника куриных эмбрионов из инкубаторов трех птицеводческих предприятий, чтобы выяснить причины массовой гибели эмбрионов, и выявил в образцах присутствие патогенных бактерий *E. coli* (18,28 %), *Staphylococcus* (14,10 %), *Pseudomonas* (11,75 %) и *Klebsiella* sp. Также имеются сведения о том, что микрофлора несушек играет ключевую роль в формировании патогенной микробиоты ЖКТ эмбриона (17). С использованием метода ПЦР в реальном времени показано, что в ЖКТ эмбрионов от кур-несушек, искусственно зараженных *Campylobacter coli*, содержание этих микроорганизмов составляло 4,35-5,65 тыс. кл/г массы тела (17). Наши результаты свидетельствуют о колонизации ЖКТ микроорганизмами уже на стадии эмбрионального развития.

Мы установили, что таксономический состав бактерий содержимого слепых отростков кишечника птицы богаче и существенно отличается от сообщества ЖКТ эмбрионов. Прежде всего, у кур вне зависимости от возраста таксономическими доминантами были не микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, а представители филума *Firmicutes* (более 55,13 %), доля которых с возрастом птицы повышалась. В составе этого филума у 26-суточных цыплят и 150- и 300-суточных кур-несушек преобладали представители класса *Clostridia*, включающего в основном бактерии семейств *Eubacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* с целлюлозо- и амилолитическими свойствами, содержание которых с возрастом снижалось. Количество бактерий со сходными свойствами из

филума *Bacteroidetes* не было связано с возрастом кур-несушек и превышало их содержание в ЖКТ эмбрионов. Поскольку у птиц практически отсутствуют собственные пищеварительные ферменты для расщепления целлюлозы и других некрахмалистых полисахаридов, роль указанных микроорганизмов в пищеварении кур исключительно важна (1, 2).

**Соотношение и число бактериальных таксонов в желудочно-кишечном тракте эмбрионов и слепых отростках кишечника у кур-несушек кросса Хайсекс Уайт разного возраста ( $\bar{X} \pm x$ , виварий ФГУП «Загорское ЭПХ ВНИТИП», Московская обл.)**

Таксономическая группа бактерий	Встречаемость (%) и общее число таксонов по группе				
	эмбрион, возраст		птица, возраст		
	6 сут	17 сут	26 сут	150 сут	300 сут
Филум <i>Firmicutes</i>	25,01±1,03	10,01±0,40	55,13±2,58	56,39±2,79	61,02±2,88
Класс <i>Clostridia</i>	5,5±0,17	1,10±0,03	31,82±1,27	20,37±0,98	17,35±0,84
Семейство <i>Lachnospiraceae</i>	0,08±0,01	1,10±0,03	4,61±0,18	1,96±0,08	1,85±0,07
Семейство <i>Eubacteriaceae</i>	0,32±0,01	н.п.д.о.	5,43±0,20	5,58±0,23	3,61±0,12
Семейство <i>Ruminococcaceae</i>	0,38±0,01	н.п.д.о.	8,72±0,35	5,18±0,20	5,95±0,22
Семейство <i>Clostridiaceae</i>	1,70±0,06	н.п.д.о.	11,40±0,45	6,19±0,28	5,20±0,21
Семейство <i>Peptococcaceae</i>	н.п.д.о.	н.п.д.о.	1,66±0,04	1,46±0,06	0,74±0,03
Семейство <i>Syntrophomonadaceae</i>	2,30±0,04	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
Класс <i>Negativicutes</i>	0,70±0,03	н.п.д.о.	12,70±0,58	7,91±0,39	8,77±0,39
Класс <i>Bacilli</i>	18,81±0,84	8,91±0,36	10,61±0,76	28,11±1,35	34,90±1,25
Порядок <i>Lactobacillales</i>	10,11±0,42	н.п.д.о.	7,28±0,33	22,56±0,95	32,48±1,22
<i>Lactobacillus</i> sp.	9,30±0,39	н.п.д.о.	5,14±0,15	16,00±0,75	26,10±1,10
<i>Enterococcus</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,61±0,03	4,18±0,18	3,06±0,14
<i>Leuconostoc</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	1,11±0,04	1,11±0,03	0,49±0,02
<i>Pediococcus</i> sp.	0,66±0,02	н.п.д.о.	0,22±0,01	0,67±0,02	1,75±0,05
<i>Weissella</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,20±0,01	0,60±0,03	1,08±0,04
<i>Trichococcus</i> sp.	0,15±0,01	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
Порядок <i>Bacillales</i>	8,70±0,41	8,91±0,36	3,35±0,15	5,08±0,19	2,33±0,11
<i>Alicyclobacillus</i> sp.	0,16±0,01	0,50±0,02	0,10±0,01	н.п.д.о.	0,08±0,00
<i>Brevibacillus</i> sp.	0,34±0,01	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
<i>Bacillus</i> sp.	7,10±0,33	6,79±0,28	2,05±0,09	2,46±0,11	1,37±0,05
<i>Paenibacillus</i> sp.	1,10±0,04	1,21±0,03	0,55±0,02	0,99±0,02	н.п.д.о.
<i>Staphylococcus</i> sp.	н.п.д.о.	0,41±0,01	0,65±0,03	1,46±0,05	0,88±0,01
<i>Listeria</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,17±0,01	н.п.д.о.
Филум <i>Actinobacteria</i>	4,53±0,21	34,2±1,02	4,12±0,17	3,18±0,12	2,21±0,11
Порядок <i>Actinomycetales</i>	4,38±0,19	13,58±0,65	3,74±0,14	2,63±0,12	2,05±0,09
Порядок <i>Bifidobacteriales</i>	0,15±0,01	20,62±0,89	0,38±0,02	0,55±0,02	0,16±0,01
Филум <i>Proteobacteria</i>	34,83±1,62	49,60±2,32	9,88±0,44	9,24±0,36	9,44±0,41
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	22,35±0,98	47,26±1,98	1,07±0,04	3,94±0,14	2,63±0,10
<i>Pantoea</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,17±0,01	0,76±0,03	0,73±0,03
<i>Salmonella</i> sp.	0,26±0,01	н.п.д.о.	0,24±0,01	0,21±0,01	0,34±0,01
<i>Morganella</i> sp.	н.п.д.о.	0,36±0,02	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
<i>Enterobacter</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,11±0,01	1,39±0,05	1,49±0,06
<i>Escherichia coli</i>	21,30±1,03	46,90±1,87	0,29±0,01	0,98±0,04	0,06±0,01
прочие ( <i>Citrobacter</i> sp., <i>Kluyvera</i> sp., <i>Rahnella</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Yersinia</i> sp.)	0,79±0,01	н.п.д.о.	0,26±0,01	0,60±0,02	0,01±0,00
Порядок <i>Burkholderiales</i>	0,31±0,01	2,00±0,08	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
<i>Burkholderia</i> sp.	0,31±0,01	0,94±0,04	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
<i>Bordetella</i> sp.	н.п.д.о.	1,09±0,03	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
Порядок <i>Pseudomonadales</i>	2,62±0,10	н.п.д.о.	7,42±0,29	3,69±0,14	2,7±0,12
<i>Acinetobacter</i> sp.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	2,90±0,13	0,50±0,02	0,55±0,02
<i>Pseudomonas</i> sp.	2,62±0,10	н.п.д.о.	4,52±0,20	3,19±0,14	2,15±0,12
Семейство <i>Caulobacteraceae</i>					
( <i>Brevundimonas</i> sp.)	9,44±0,42	0,31±0,02	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
Семейство <i>Pasteurellaceae</i>					
( <i>Pasteurella</i> sp., <i>Haemophilus</i> sp.)	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,48±0,03	0,92±0,02	0,69±0,02
Семейство <i>Campylobacteraceae</i>					
( <i>Campylobacter</i> sp., <i>Arcobacter</i> sp.)	н.п.д.о.	н.п.д.о.	0,91±0,04	0,69±0,03	3,42±0,60
Порядок <i>Rickettsiales</i>	0,11±0,01	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.	н.п.д.о.
Филум <i>Tenericutes</i> ( <i>Mycoplasma</i> sp.)	н.п.д.о.	н.п.д.о.	1,16±0,05	1,01±0,03	1,13±0,04
Филум <i>Bacteroidetes</i>	5,42±0,22	н.п.д.о.	8,88±0,35	9,68±0,44	9,24±0,39
Филум <i>Fusobacteria</i>	н.п.д.о.	н.п.д.о.	1,39±0,04	2,21±0,12	2,71±0,33
Неидентифицированные бактерии	30,21±1,42	6,19±0,28	19,44±0,56	18,29±0,86	14,25±0,69
Общее число фило типов, шт.	75±2,75	30±1,20	224±10,23	255±12,46	175±8,12

Примечание. н.п.д.о. — ниже предела достоверного определения методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism).

По сравнению с эмбрионами у взрослых особей значительно по-

вышалось количество бактерий класса *Negativicutes*, которые играют важную роль в пищеварении, ферментируя органические кислоты, включая лактат, с образованием летучих жирных кислот, необходимых для обеспечения птицы энергией (2).

Доля микроорганизмов из порядков *Bacillales* и *Bifidobacteriales*, характеризующихся высокой антагонистической активностью в отношении патогенной микрофлоры, уменьшалась с возрастом птицы и была существенно ниже, чем в ЖКТ эмбрионов. Обратная тенденция наблюдалась в отношении лактобактерий порядка *Lactobacillales*, наибольшую долю которых отмечали у 300-суточной птицы. Разнообразие лактобактерий у кур было выше, чем у эмбрионов, и включало также представителей родов *Weissella*, *Leuconostoc* и *Enterococcus*.

Разнообразие патогенных микроорганизмов у 26-суточных цыплят и 150- и 300-суточных особей существенно превышало этот показатель у эмбрионов. ЖКТ птицы заселяли новые патогены из родов *Listeria*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Mycoplasma*, *Acinetobacter*, семейств *Pasteurellaceae*, *Campylobacteraceae*, филума *Fusobacteria*. Одни микроорганизмы из перечисленных таксонов (*Pantoea*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*) относятся к возбудителям дисбиотических нарушений в кишечнике млекопитающих и птицы, другие (род *Mycoplasma*, семейство *Pasteurellaceae*) обнаруживаются преимущественно в респираторном тракте у птицы и считаются возбудителями заболеваний дыхательных органов. Значительный интерес представляло присутствие в слепых отростках кишечника кур бактерий филума *Fusobacteria*, которых раньше относили к типичным обитателям рубца жвачных (23). Стоит отметить, что о наличии некоторых перечисленных патогенов в ЖКТ птицы ранее сообщалось только по результатам молекулярно-генетических исследований (24, 25).

Интересно, что ряд патогенов, обнаруживаемых в ЖКТ эмбрионов, включая бактерии порядков *Burkholderiales*, *Rickettsiales* и рода *Brevundimonas*, не выявляли у 26-суточных цыплят, а также 150- и 300-суточных кур-несушек. При этом количество неидентифицированных бактерий с возрастом птицы снижалось.

Таким образом, с помощью T-RFLP-анализа в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) куриных эмбрионов было выявлено богатое таксономическое разнообразие бактерий, включая представителей индигенной нормофлоры ЖКТ вылупившихся цыплят и взрослой птицы, условно-патогенной микрофлоры, патогенов, некультивируемых микроорганизмов. Структура микробиоценоза содержимого ЖКТ эмбрионов кур на 6-е сут инкубации характеризовалась большим таксономическим разнообразием, чем на 16-е сут. Выявлено, что в процессе онтогенеза в ЖКТ птицы происходит развитие бактериального сообщества, в его составе появляются новые микроорганизмы. Структура сообщества слепых отростков 26-суточных цыплят, а также 150- и 300-суточной птицы представлена большим разнообразием микроорганизмов, включая условно-патогенные и патогенные. Можно заключить, что становление микробиоэкологической системы птиц (содержимое ЖКТ в совокупности с населяющей его микрофлорой) происходит уже на стадии эмбрионального развития. Вероятно, структура микробиотопа ЖКТ эмбриона формируется под влиянием микрофлоры несушки посредством вертикальной передачи с помощью бактериальной транслокации. Возможно, что микрофлора, колонизирующая ЖКТ куриных эмбрионов, проникает через поры в оболочке яйца. При этом микроорганизмы, присутствующие в ЖКТ эмбриона, служат основой формируемого стартового кишечного биоценоза у вылупившихся цыплят, кото-

рым во многом определяется их жизнеспособность, устойчивость к патогенам и развитие.

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства,  
141311 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад, ул. Птицерадская, 10,  
e-mail: olga@vnitip.ru;

<sup>2</sup>ООО «Биотроф»,  
192288 Россия, г. Санкт-Петербург, а/я 183,  
e-mail: nikonov@biotrof.ru

Поступила в редакцию  
13 сентября 2016 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, V. 51, № 6, pp. 883-890

## POULTRY GASTROINTESTINAL MICROBIOME CHANGES DURING ONTOGENESIS

V.I. Fisinin<sup>1</sup>, G.Yu. Laptev<sup>2</sup>, I.N. Nikonov<sup>2</sup>, L.A. Il'ina<sup>2</sup>, E.A. Yildirim<sup>2</sup>, V.A. Filippova<sup>2</sup>, N.I. Novikova<sup>2</sup>, A.A. Grozina<sup>1</sup>, T.A. Egorova<sup>1</sup>, T.N. Lenkova<sup>1</sup>, V.A. Manukyan<sup>1</sup>, I.A. Egorov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research and Technological Poultry Institute, Federal Agency of Scientific Organizations, 10, ul. Pti-tsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia, e-mail olga@vnitip.ru;

<sup>2</sup>JSC «Biотrof», Kolpino, St. Petersburg, 192288 Russia, e-mail nikonov@biotrof.ru

Acknowledgements:

Supported by grant from Russian Science Foundation (project № 14-16-00140 «Modern views on the intestinal microflora of poultry in different diets: molecular genetic approaches»)

Received September 13, 2016

doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.883eng

### Abstract

Microorganisms which inhabit gut play great role in providing with nutrients, antibiotics, hormones and vitamins necessary for poultry health and performance. Therefore study of gut microbiome changes during ontogenesis seems to be essential. The structure of gut microflora in poultry embryos is of particular interest and debated because of very few publications on the problem. Despite embryo intestine is commonly considered sterile there are several reports on gut colonization by microorganisms in embryos during ontogenesis. Using T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis to generate a fingerprint of a microbial community we compared gut flora in chick embryos on days 6 and 17 to those in 26-day, 150-day and 300-day old Hisex White layers. Unlike accepted view, a high biodiversity was seen in embryo gut with *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* mainly) predominated. *Clostridia*, *Bacteroides*, *Negativicutes*, *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales* were also found in contrast to earlier reports of their presence only in chicks at hatching and in adult poultry gut. Moreover, in the embryo gut we found the causal agents of dangerous animal disease, *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. and *Rickettsiales* bacteria. Interestingly, the embryo gut biodiversity on day 6 was higher as compared to day 17 ( $75 \pm 2.75$  phylotypes vs  $30 \pm 1.20$  phylotypes). In the layers aged 26, 150 and 300 days the diversity was much higher (over  $175 \pm 8.12$  phylotypes) as compared to embryos due to new members involved into gut bacterial community. Moreover, the poultry aged 300 days was lower both in the total diversity and in the percentage of unidentified microorganisms when compared to 26-day and 150-day old hens. In the adults, the predominating microbial taxa changed, in particular, *Clostridia* and *Negativicutes* became more abundant whereas *Bacillales* and *Bifidobacteriales* were depressed. Our findings indicate gut colonization by *Lactobacilales* and pathogenic *Listeria* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Mycoplasma* sp., *Acinetobacter* sp., *Pasteurellaceae*, *Campylobacteraceae*, *Fusobacteria* which occurred during ontogenesis. Thus the gut microbiome formation starts in embryo which is important for hatching and growing healthy poultry.

Keywords: gut microflora, caecum, ontogenesis, hens, embryo, T-RFLP.

### REFERENCES

1. Timoshko M.A. *Mikroflora pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* [Microflora of alimentary canal in farm animals]. Kishinev, 1990 (in Russ.).
2. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* [Study of microflora in alimentary canal of farm animals — methods]. Moscow, 2006 (in Russ.).
3. Salanitro J., Fairchilds I., Zgornicki Y. Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl. Microbiol.*, 1974, 27: 678-687.
4. Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract:

- influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98: 4301-4309 (doi: 10.1007/s00253-014-5646-2).
5. Mead G.C. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool. Suppl.*, 1989, 3: 48-54.
  6. Amit Romach E., Sklan D., Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Sci.*, 2004, 83: 1093-1098.
  7. Dibner J.J., Richards J.D., Knight C.D. Microbial imprinting in gut development and Health. *J. Appl. Poultry Res.*, 2008, 17: 174-188 (doi: 10.3382/japr.2007-00100).
  8. Barnes E. The intestinal microbiota of poultry and game birds during life and after storage. *J. Appl. Bacteriol.*, 1979, 46: 407-419.
  9. Mead G.C. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool.*, 1989, 3: 48-54 (doi: 10.1002/jez.1402520508).
  10. Torok V., Ophel-Keller K., Loo M., Hughes R. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(3): 783-791 (doi: 10.1128/AEM.01384-07).
  11. Park S.H., Lee S.I., Ricke S.C. Microbial populations in naked neck chicken ceca raised on pasture flock fed with commercial yeast cell wall prebiotics via an Illumina MiSeq Platform. *PLoS ONE*, 2016, 11(3): e0151944 (doi: 10.1371/journal.pone.0151944).
  12. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59: 143-169.
  13. *Instruktsiya po sanitarno-mikrobiologicheskomu kontrolyu tushek, myasa ptitsy, pitseproduktov, yaits i yaitseproduktov na pitsevodcheskikh i pererabatyvayushchikh predpriyatiyakh* [Instruction for the sanitary-microbiological control of poultry carcasses, meat, eggs and egg products in the poultry production and processing enterprises]. Moscow, 1990 (in Russ.).
  14. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, 1982.
  15. van der Wielen P.W.J.J., Keuzenkamp D.A., Lipman L.J.A., van Knapen F., Biesterveld S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microbiol. Ecol.*, 2002, 44: 286-293.
  16. Maiorka A., Dahlke F., de Azevedo Morgulis M.S.F. Broiler adaptation to post-hatching period. *Ciencia Rural*, 2006, 36: 701-708.
  17. Kizerwetter-Swida M., Binek M. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *J. Animal Feed Sci.*, 2008, 17: 224-232 (doi: 10.22358/jafs/66602/2008).
  18. Babaca Z. Isolation of bacterial pathogens from dead in-shell chicken embryos from local hatcheries. *J. Vet. Sci. Technol.*, 2014, 5: 170-171.
  19. Rossi D.A., Fonseca B.B., de Melo R.T., da Silva Felipe G., da Silva P.L., Mendonça E.P., Filgueiras A.L., Beletti M.E. Transmission of *Campylobacter coli* in chicken embryos. *Brazil. J. Microbiol.*, 2012, 43(2): 535-543 (doi: 10.1590/S1517-83822012000200014).
  20. Nakphaichit M., Thanomwongwattana S., Phraephaisarn C., Sakamoto N., Keawsompong S., Nakayama J., Nitisinprasert S. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB AC5 during post hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry Sci.*, 2011, 12(90): 2753-2765 (doi: 10.3382/ps.2011-01637).
  21. Lowder B.V., Fitzgerald J.R. Human origin for avian pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 2010, 4(1): 283-284 (doi: 10.4161/viru.1.4.11838).
  22. Biberstein E.L., Hirsh D.C. *Bordetella in veterinary microbiology*. Reino Unido, Blackwell Sci., Oxford, 1999: 148-150.
  23. Gong J., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Sabour P.M., Wheatcroft R., Chen S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 208(1): 1-7 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11051.x).
  24. Torok V.A., Hughes R.J., Mikkelsen L.L. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiota in broiler chickens across various feeding trials. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(17): 5868-5878 (doi: 10.1128/AEM.00165-11).
  25. Rinttila T., Apajalahti J. Intestinal microbiota and metabolites — implications for broiler chicken health and performance. *J. Appl. Poultry Res.*, 2013, 22(3): 647-658 (doi: 10.3382/japr.2013-00742).