

Контролировать все этапы производства кормов довольно трудно. Токсины никогда не распределяются равномерно по массе зерна, поскольку при хранении имеет место очаговое поражение зерна плесневыми грибами. В связи с этим анализ кормов на микотоксины не всегда отражает реальную картину. Проблема контроля содержания микотоксинов в кормах обусловлена как сложностью методов их определения, так и нерегулярностью обнаружения. Оптимальным решением является использование в кормах сорбентов микотоксинов, и здесь важно сделать правильный выбор сорбента и определить норму ввода.

Ветеринарное обеспечение птицеводства в настоящее время сталкивается еще с одной острой пробле-

мой — нехваткой квалифицированных специалистов. Мы считаем, что более тесное сотрудничество ВУЗов и НИИ путем создания филиалов кафедр и привлечения в качестве лекторов научных сотрудников, а также проведение совместных исследований будет способствовать решению этой проблемы.

Развитие птицеводческой отрасли является важной стратегической задачей при решении проблемы обеспечения населения России качественными и безопасными продуктами животного происхождения. В соответствии с Программой фундаментальных научных исследований (ФНИ) государственных академий наук на 2013–2020 гг. главным направлением научных исследований является разработка молекулярно-биологических и нано-

биотехнологических методов создания биопрепаратов нового поколения, технологий и способов их применения для борьбы с особо опасными инфекционными, паразитарными и незаразными болезнями животных. Профессионализм ветеринарных специалистов птицеводческих хозяйств, тесный контакт науки и производства, а также широкое внедрение научных разработок, прежде всего отечественных, позволят обеспечить эпизоотическое благополучие птицеводческой отрасли и соответственно производство высококачественной и безопасной продукции. □

*Для контакта с автором:
Дмитриева Маргарита Евгеньевна
e-mail: vnivip17@yandex.ru*

УДК 576.8:636.085.52

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ МЕТОДОМ T-RFLP

Фисинин В.И., президент НКО «Росптицесоюз», директор ФГБНУ ВНИТИП, академик РАН, д-р с.-х. наук

Егоров И.А., заместитель директора, академик РАН, д-р биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФГБНУ ВНИТИП)

Лаптев Г.Ю., директор, д-р биол. наук

Никонов И.Н., главный специалист по координации НИОКР

Ильина Л.А., начальник молекулярно-генетической лаборатории, канд. биол. наук

Йылдырым Е.А., биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории, канд. биол. наук

Филиппова В.А., биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

Новикова Н.И., заместитель директора, канд. биол. наук

ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург

Аннотация: В составе микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) эмбрионов кур кросса «Хайсекс Уайт» было обнаружено 30 микробных флотипов, а эмбрионов кур кросса «Хайсекс Браун» — 38 флотипов. В ЖКТ эмбрионов кур «Хайсекс Уайт» доминировали (47,3%) типичные представители кишечной микрофлоры птиц — микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, представители порядков *Actinomycetales* (13,6%), *Bifidobacteriales* (20,6%) и также семейства *Lachnospiraceae* (1,1%). В микробиоме ЖКТ эмбрионов кросса «Хайсекс Браун» доминировали (94,8%) бактерии-патогены порядка *Rickettsiales*. В метагеноме ЖКТ обоих кроссов в небольшом количестве присутствовали гены неидентифицированных бактерий.

Summary: *In gut microflora content of White Hy-Sex cross chicken embryos 30 microbe phylotypes have been detected and in Brown Hy-Sex embryos 38 microbe phylotypes have been detected. In White Hy-Sex embryos the typical poultry gut microflora representatives have dominated (47.3%) that is Enterobacteriaceae family microorganisms, representatives of Actinomycetales (13.6%), Bifidobacteriales (20.6%) and also Lachnospiraceae family (1.1%). In gut microbiome of Brown Hy-Sex embryos Rickettsiales pathogen bacteria have dominated. Small amounts of undifferentiated bacteria gens have been detected in gut metagenome of both crosses*

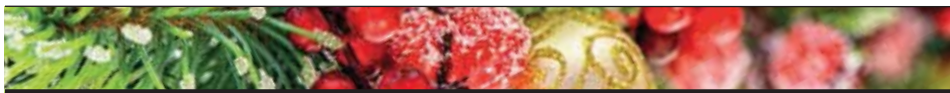
Ключевые слова: микрофлора кишечника, яйцо, куриные эмбрионы, метод T-RFLP.

Key Words: *gut microflora, egg, chicken embryos, T- RFLP method.*

Традиционно считается, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) эмбрионов птиц стерилен [1–3], а

формирование микробиоценоза пищеварительной системы птенцов происходит после вылупления в резуль-

тате контакта с окружающей средой [4–6]. Однако существуют отдельные публикации результатов исследований



с использованием классических микробиологических методов [7, 8], а также данные ПЦР в реальном времени [9], демонстрирующие, что микроорганизмы способны колонизировать кишечник цыплят на стадии эмбрионального развития внутри яйца.

Вопрос изучения состава микроорганизмов ЖКТ эмбрионов кур остается дискуссионным, поскольку результаты публикуемых исследований весьма немногочисленны и направлены в основном на изучение патогенной для человека микрофлоры.

Целью работы было выявление состава и структуры микробных сообществ ЖКТ куриных эмбрионов в период инкубации с использованием метода определения полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов — T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism).

Материал для исследования представлял собой среднесмешанные пробы содержимого кишечника эмбрионов кур кроссов «Хайсекс Уайт» и «Хайсекс Браун» 16-суточного периода инкубации. Яйца инкубировали в инкубатории ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства».

Отбор проб и подготовку образцов проводили в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ+» с соблюдением стерильности в соответствии с требованиями [11].

Состав микробного сообщества ЖКТ куриных эмбрионов исследовали методом анализа T-RFLP.

Принадлежность бактерий к определенной филогенетической группе определяли с помощью программы *Fragment Sorter*.

Результаты исследований с использованием T-RFLP-анализа показали, что структура микробиоценоза образцов содержимого ЖКТ эмбрионов кур обоих кроссов характеризовалась достаточно богатым таксономическим разнообразием. Так, в составе микрофлоры ЖКТ эмбрионов кур кросса «Хайсекс Уайт» было обнаружено 30 фило типов различных микроорганизмов, а у эмбрионов кур кросса «Хайсекс Браун» — 38 фило типов (табл.).

Структура микробных сообществ эмбрионов кур двух кроссов различалась по таксономическому составу. Так,

Таблица
Состав бактериального сообщества в ЖКТ куриных эмбрионов

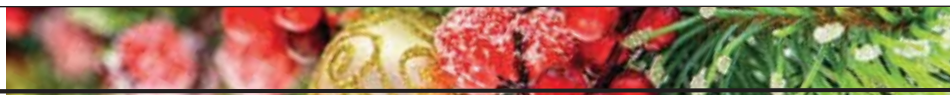
Микробный таксон	Число бактерий, %	
	Кросс «Хайсекс Уайт»	Кросс «Хайсекс Браун»
Tun Firmicutes	10,0	2,1
Порядок Lactobacillales:	–	0,44
<i>Lactobacillus sp.</i>	–	0,16
<i>Enterococcus sp.</i>	–	0,04
<i>Tetragenococcus sp.</i>	–	0,25
Порядок Bacillales:	8,9	1,7
<i>Alicyclobacillus sp.</i>	0,5	0,19
<i>Brevibacillus sp.</i>	–	0,14
<i>Bacillus sp.</i>	6,8	1,08
<i>Paenibacillus sp.</i>	1,2	0,28
<i>Staphylococcus sp.</i>	0,41	–
Сем. Lachnospiraceae	1,1	–
Tun Actinobacteria	34,2	0,5
Порядок Actinomycetales	13,6	0,31
Порядок Bifidobacteriales	20,6	0,19
Tun Proteobacteria	49,3	0,91
Сем. Enterobacteriaceae:	47,3	0,15
<i>Klebsiella sp.</i>	–	0,08
<i>Salmonella sp.</i>	–	0,07
<i>Morganella sp.</i>	0,36	–
<i>Escherichia coli</i>	46,9	–
Порядок Burkholderiales:	2,0	0,76
<i>Burkholderia sp.</i>	0,94	0,16
Порядок Burkholderiaceae:	–	0,05
<i>Bordetella sp.</i>	1,1	–
<i>Pseudomonas sp.</i>	–	0,55
Tun Bacteroidetes:	–	0,49
<i>Bacteroidetes sp.</i>	–	0,08
Некультивируемые представители	–	0,41
Tun Proteobacteria	0,3	94,8
Некультивируемые представители порядка Rickettsiales	–	94,8
<i>Caulobacter sp.</i>	–	0,04
<i>Brevundimonas sp.</i>	0,3	–
Неидентифицированные бактерии	6,2	1,2
Общее количество фило типов	30	38

Примечание. (–) — бактерии не определяются

в кишечнике эмбрионов кур кросса «Хайсекс Уайт» доминировали (47,3%) типичные представители кишечной микрофлоры птиц — микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, в котором основную долю (46,9%) составляли бактерии, относящиеся к виду *Escherichia coli*. В составе микробиоценоза кишечника эмбрионов кур кросса «Хайсекс Уайт» также

были выявлены другие представители индигенной микрофлоры ЖКТ, ранее обнаруженные у вылупившихся цыплят и взрослых птиц, — представители порядков Actinomycetales (13,6%), Bifidobacteriales (20,6%), а также семейства Lachnospiraceae (1,1%).

Таким образом, колонизация ЖКТ бактериями, отвечающими за адаптацию организма птицы к внешней



среде, происходит уже на стадии эмбрионального развития. При этом в метагеномном сообществе ЖКТ эмбрионов кур кросса «Хайсекс Уайт» отсутствовали типичные представители автохтонной симбиотической кишечной микрофлоры птиц — факультативно-анаэробные бактерии порядка *Lactobacillales*, тогда как в ЖКТ эмбрионов кур кросса «Хайсекс Браун» данные микроорганизмы были выявлены в количестве 0,44%. Кроме того, в ЖКТ эмбрионов кур обоих кроссов было обнаружено некоторое количество генотипов неидентифицированных бактерий. В метагеномном сообществе ЖКТ эмбрионов кур кросса «Хайсекс Браун» доминировали бактерии порядка *Rickettsiales* (94,8%) — патогены, переносчиками которых являются представители типа *Arthropoda*.

Стоит отметить, что бактерии рода *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. и *E. coli*, обнаруженные нами в ЖКТ эмбрионов во время инкубационного периода, способны вызывать омфалит (пупочно-желточную инфекцию) — опасное заболевание, которое является основной причиной смертности цыплят, начиная с момента вылупления до 14 дней жизни. Бактерии рода *Bordetella* — это возбудители заболеваний респираторного тракта птиц, в основном цыплят раннего возраста. Вероятно, предпосылкой к возникновению описанных заболеваний является неблагоприятный состав микрофлоры ЖКТ, сопровождающийся увеличением численности вышеназванных патогенов на стадии эмбрионального развития птиц.

Результаты наших исследований совпадают с данными *Babaca Z.* [8], изучившего 3000 образцов содержимого ЖКТ куриных эмбрионов из инкубаторов трех птицеводческих фабрик с использованием классических микробиологических высевов. Эксперименты проводились с целью выяснения причин массовой гибели куриных эмбрионов. Оказалось, что спектр микроорганизмов, способных вызвать гибель эмбриона, разнообразен: большой удельный вес составляли бактерии *E. coli* (18,28%), *Staphylococcus* sp. (14,10%), *Pseudomonas* sp. (11,75%), *Klebsiella* sp. (9,4%).

Кроме того, опубликованы данные, свидетельствующие о том, что микрофлора несушки играет ключевую роль в формировании патогенной микробиоты ЖКТ эмбриона [9]. С использованием метода ПЦР в реальном времени исследователями показано, что в ЖКТ эмбрионов, полученных от кур-несушек, искусственно зараженных *Campylobacter coli*, содержание данных микроорганизмов составляло 4,35–5,65 тыс. клеток/г массы тела.

Помимо представителей порядка *Rickettsiales*, в ЖКТ куриных эмбрионов был обнаружен ряд других опасных патогенов: бактерий родов *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bordetella* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. и др.

Таким образом, становление микробиоэкологической системы птиц (формирование содержимого ЖКТ в совокупности с населяющей его микрофлорой) происходит уже на стадии эмбрионального развития. Вероятно, структура микробиоты ЖКТ эмбриона формируется под влиянием микрофлоры несушки путем вертикальной передачи с помощью бактериальной транслокации. Другим вероятным источником микрофлоры, колонизирующей ЖКТ куриных эмбрионов, могут являться поры в оболочке яйца. Микроорганизмы, присутствующие в ЖКТ эмбриона, являются основой, которая определяет формирование стартового кишечного биоценоза вылупившихся цыплят.

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».

Литература

1. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных. — Кишинев: «Штиинца», 1990. — 161 с.
2. Van der Wielen P.W.J.J. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth / P.W.J.J. Van der Wielen, D.A. Keuzenkamp, L.J.A. Lipman, F. van Knapen, S. Biesterveld // *Microbiol. Ecology*. — 2002. — V. 44. — P. 286–293.

3. Maiorka A. Broiler adaptation to post-hatching period / A. Maiorka, F. Dahlke, Morgulis M.S.F. de Azevedo // *Ciência Rural*. — 2006. — V. 36. — P. 701–708.

4. Mead G.C. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized // *J. Exp. Zool. Suppl.* — 1989. — V. 3. — P. 48–54.

5. Amit-Romach E. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers / E. Amit-Romach, D. Sklan, Z. Uni // *Poultry Science*. — 2004. — V. 83. — P. 1093–1098.

6. Dibner J.J. Microbial imprinting in gut development and health / J.J. Dibner, J.D. Richards, C.D. Knight // *J. Appl. Poultry Res.* — 2008. — V. 17. — P. 174–188.

7. Kizerwetter-Swid M. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken / M. Kizerwetter-Swid, M. Binek // *Journal of Animal and Feed Sciences*. — 2008. — V. 17. — P. 224–232.

8. Babaca Z. Isolation of bacterial pathogens from dead-in-shell chicken embryos from local hatcheries // *J. Veterinar Science Technol.* — 2014. — V. 5. — № 2. — P. 170–171.

9. Rossi D.A. Transmission of *Campylobacter coli* in chicken embryos / D.A. Rossi, B.B. Fonseca, R.T. de Melo, G. da Silva Felipe, P.L. da Silva, E.P. Mendonça, A.L.L. Filgueiras, M.E. Beletti // *Brazilian Journal of Microbiology*. — 2012. — V. 43. — № 2. — P. 535–543.

10. Amann R.I. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R.I. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer // *Microb. Rev.* — 1995. — V. 59. — P. 143–169.

11. Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и перерабатывающих предприятиях. — М., утв. Госкомпродом СССР 30.08.1990.

12. Маниатис Т., Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. — М.: «Мир», 1984. — 480 с. □

Для контактов с авторами:

Фисинин Владимир Иванович

e-mail: vnitip@vnitip.ru

Лантев Георгий Юрьевич

Никонов Илья Николаевич

e-mail: nikonov@biotrof.ru

Ильина Лариса Александровна

Йылдырым

Елена Александровна

Филиппова

Валентина Анатольевна

Новикова Наталья Ивановна

Егоров Иван Афанасьевич