

Метапробиотики вместо антибиотиков

Йылдырым Е.А., доктор биологических наук

Ильина Л.А., кандидат биологических наук

Тюрина Д.Г., кандидат экономических наук

Дубровин А.В.

Филиппова В.А.

Новикова Н.И., кандидат биологических наук

Большаков В.Н., кандидат сельскохозяйственных наук

Лаптев Г.Ю., доктор биологических наук

ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург

Манукян В.А., доктор сельскохозяйственных наук

ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН (ФНЦ «ВНИТИП» РАН)

Тарлавин Н.В.

Меликиди В.Х.

Биконя С.Н.

Васильева К.В.

ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург

Аннотация: Большой интерес для промышленного птицеводства представляет применение биопрепаратов на основе комбинаций пробиотических штаммов микроорганизмов и их метаболитов - органических кислот. Один из препаратов подобного рода - это метапробиотик Пробиоцид-Ультра («БИОТРОФ»), комбинация естественных бактериальных метаболитов (фумаровой и лимонной кислот) и двух штаммов *Bacillus spp.*, действующих в синергизме. Пробиоцид-Ультра не только эффективно стимулирует рост нормофлоры кишечника, выполняя функции классического пробиотика, но и в разы повышает способность подавлять рост патогенных бактерий благодаря подкисляющей способности органических кислот. Биопрепарат позитивно действует непосредственно на организм хозяина, повышая уровень резистентности, активируя работу ферментов, стимулируя обновление клеток эпителия. Поэтому, с одной стороны, Пробиоцид-Ультра работает подобно антибиотикам, как лечебным, подавляя патогенную микрофлору, так и кормовым, стимулируя увеличение продуктивности. С другой стороны, в отличие от антибиотиков, этот препарат не создает дополнительную нагрузку на ослабленный иммунитет.

Ключевые слова: Пробиоцид-Ультра, подкислитель, пробиотик, микробиом кишечника, NGS-секвенирование, бройлеры.

Из-за постоянного и несистемного применения антибиотиков в животноводстве и птицеводстве эффективность их воздействия заметно падает, так как патогенные бактерии достаточно быстро вырабатывают антибиотикорезистентность - устойчивость к данным лекарственным веществам. Например, исследования, проведенные в США, продемонстрировали, что резистентность к гентамицину у изолятов *Campylobacter coli*, выделенных из куриного мяса, увеличилась с 1% в 2007 г. до 18% в 2011 г. У бактерий *Salmonella*

spp. было отмечено стремительное развитие множественной лекарственной устойчивости к антибиотикам, таким как тетрациклины, сульфаниламиды, стрептомицин, канамицин, хлорамфеникол и некоторые β -лактамы антибиотиков.

По этой причине многие развитые страны давно начали борьбу с использованием антибиотиков при выращивании животных и птицы. В последние годы в нашей стране в практике птицеводства антибиотики широко использовались для массовой профилактики

заболеваний и стимуляции роста птицы, однако в 2019 г. произошли резкие изменения, инициированные государством. Правительство России своим распоряжением №604-р от 30.03.2019 в рамках реализации государственной Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации до 2030 г. устанавливает запрет на использование противомикробных препаратов для ветеринарного применения не в лечебных целях с 2020 г. Кроме того, с 2020 г. стартует регулиро-





вание использования противомикробных препаратов при изготовлении кормов и вступают в силу соответствующие изменения в законе «О ветеринарии».

Однако специалисты, принимающие решения по структуре рационов, знают, что вывод кормового антибиотика из рациона может дорого обойтись. Если в Дании конверсия корма у бройлеров при этом снижалась на 2,3%, а исследования в США зафиксировали увеличение смертности на 0,5% [10], то что может произойти в России, на наших масштабных птицефабриках?

Очевидно, вывод антибиотика без ввода его заменителя приведет к ухудшению производственных и экономических показателей.

При этом известно, что кормовые антибиотики не могут являться единственным средством модификации структуры микрофлоры. Большой интерес представляет комбинация биопрепаратов на основе пробиотических штаммов микроорганизмов и их метаболитов - органических кислот.

Комплексное решение

Профиль кишечной микробиоты - основной фактор, регулирующий здоровье, иммунитет и продуктивность птицы. Макроорганизм необходимо защищать от целого спектра патогенных микроорганизмов, выработавших разнообразие механизмы выживания и резистентности в кишечнике. Поэтому для обеспечения полноценной защиты требуется использование комплексных решений.

Метапробиотики - это биопрепараты нового поколения на основе пробиотических штаммов бактерий, дополнительно обогащенные полезными бактериальными метаболитами (органическими кислотами), которые, благодаря синергическому эффекту, результивно модулируют состав микробиома пищеварительной системы.

Наиболее удачный пример препаратов подобного рода - это метапробиотик Пробиоцид-Ультра («БИОТРОФ»), объединяющий комбинацию естественных бактериальных метаболитов (фумаровой и лимонной кислот) и двух штаммов *Bacillus spp.*, действующих в синергизме.

Пробиоцид-Ультра не только эффективно стимулирует рост нормофлоры кишечника, выполняя функции классического пробиотика, но и в разы повышает способность подавлять рост патогенных бактерий благодаря подкисляющей способности органических кислот. Кроме того, биопрепарат позитивно действует непосредственно на организм хозяина, повышая уровень резистентности, активируя работу ферментов, стимулируя обновление клеток эпителия. Поэтому, с одной стороны, Пробиоцид-Ультра работает подобно антибиотикам, как лечебным, подавляя патогенную микрофлору, так и кормовым, стимулируя увеличение продуктивности. С другой стороны, в отличие от антибиотиков, этот препарат не создает дополнительную нагрузку на ослабленный иммунитет.

Благодаря таким широким метаболическим возможностям Пробиоцид-Ультра обладает высоким уровнем антимикробной активности в отношении кишечных патогенов *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus cecorum*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и др. Снижение содержания патогенов в кишечнике доходит до 100%.

Механизм воздействия на микробиом

Остановимся подробно на анализе многоступенчатых механизмов модуляции кишечного микробиома при использовании препарата Пробиоцид-Ультра.

Давно известно, что короткоце-

почечные органические кислоты (с количеством атомов углерода менее 6) проявляют выраженные бактериостатические и бактерицидные свойства.

Короткоцепочечные органические кислоты, такие как фумаровая и лимонная, в составе препарата Пробиоцид-Ультра обеспечивают подкисление химуса кишечника, что создает барьер для проникновения и развития патогенных бактерий. Это сводит к минимуму размножение чувствительных к уровню pH патогенов (например, *Clostridium perfringens*).

Ключевым механизмом действия фумаровой и лимонной кислот является также их способность ингибировать жизнедеятельность Грам-отрицательных патогенов, таких как *Salmonella spp.*, *Pasteurella spp.*, *E. coli*, на клеточном уровне путем прямой диффузии через клеточную мембрану. Дело в том, что в кислой среде кишечника органические кислоты сохраняют недиссоциированное состояние. Являясь липофильными, они могут диффундировать через полупроницаемые клеточные мембраны патогенов. Попадая в бактериальную клетку, где уровень pH цитоплазмы выше, чем во внешней среде (около 7,0), кислоты диссоциируют и, как следствие, уровень pH снижается, при этом высвобождаются H^+ и анионы кислотного остатка. Это инициирует нарушение ферментативных реакций и систем транспорта питательных веществ в клетках патогенов. Кроме того, мишенью для молекул органических кислот является также ДНК бактерий.

В отличие от большинства патогенов, кислотоустойчивые представители нормофлоры, такие как лакто- и бифидобактерии, не чувствительные к снижению уровня pH, достаточно легко переносят дисбаланс между внутренним и

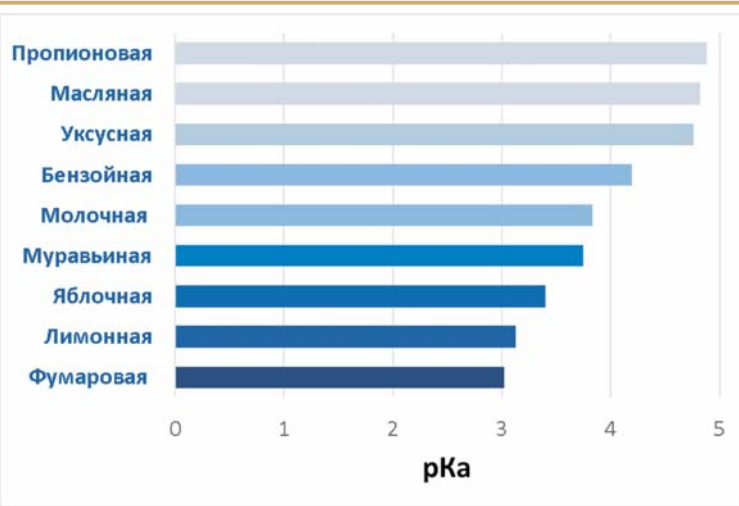


Рисунок 1. Значения показателей константы кислотности (рКа) органических кислот, используемых в составе различных подкислителей

вило: чем ниже значение pK_a , тем сильнее кислота. Как видно из рис. 1, самые низкие значения константы кислотности характерны для фумаровой и лимонной кислот, что определяет их высокую эффективность по сравнению с другими кислотами в составе подкислителей.

В тоже время, некоторые болезнетворные микроорганизмы могут развить толерантность для выживания в кислой среде. Например, было обнаружено появление кислоторезистентных штаммов *Salmonella spp.* при длительном воздействии пониженного уровня pH [4].

Именно поэтому Пробиоцид-Ультра дополнительно обогащен живыми бактериями. Пробиотические штаммы бактерий *Bacillus spp.* в составе Пробиоцид-Ультра служат дополнительным рубежом защиты микробиоты ЖКТ посредством бактериального антагонизма, конкурентного исключения патогенов и колонизационной резистентности благодаря свойствам адгезии (прикрепления) к клеткам кишечного эпителия (рис. 2). Специально отобраные микроорганизмы служат источником поступления в кишечник антибиотиков естественного происхождения - бактериоцинов

внешним pH. В то же время, иные представители полезной нормофлоры, такие как целлюлозолитические бактерии *Ruminococcus*, *Eubacterium*, расщепляющие клетчатку кормов, имеют другие механизмы защиты от подкисления. Дело в том, что у Грам-положительной группы бактерий, к которой они относятся, наблюдается более высокий уровень внутриклеточного калия по сравнению с Грам-отрицательными патогенами, что способствует эффективной нейтрализации анионов кислот. Отмечено [1], что Грам-положительные бактерии чувствительны только к длинноцепочечным органическим кислотам, в то же время, Грам-отрицательные бактерии (большинство патогенов) не могут противостоять кислотам с менее чем 8 атомами углерода в молекуле.

Эти механизмы объясняют избирательное действие фумаровой и лимонной кислот на подавление патогенных бактерий и стимуляцию роста полезных микроорганизмов, что, в конечном итоге, формирует благоприятный состав микробиома. Важно, что не все органические кислоты обладают такой избирательностью. В исследованиях коллектива ученых [2] показано, что ведение в рацион 1,0% муравьиной кислоты

приводило к снижению концентрации полезных лактобацилл. Именно поэтому эффект от введения в рацион муравьиной кислоты не всегда стабилен. Например, сообщалось, что при введении в корма для бройлеров муравьиной кислоты в количестве 5-10 г/кг наблюдали уменьшение прироста живой массы по сравнению с контролем [3].

Доказано, что влияние органических кислот на снижение уровня pH и подавление патогенов изменяется в зависимости от степени их диссоциации, характеризующейся показателем константы кислотности (pK_a), разным для каждой кислоты. Существует пра-

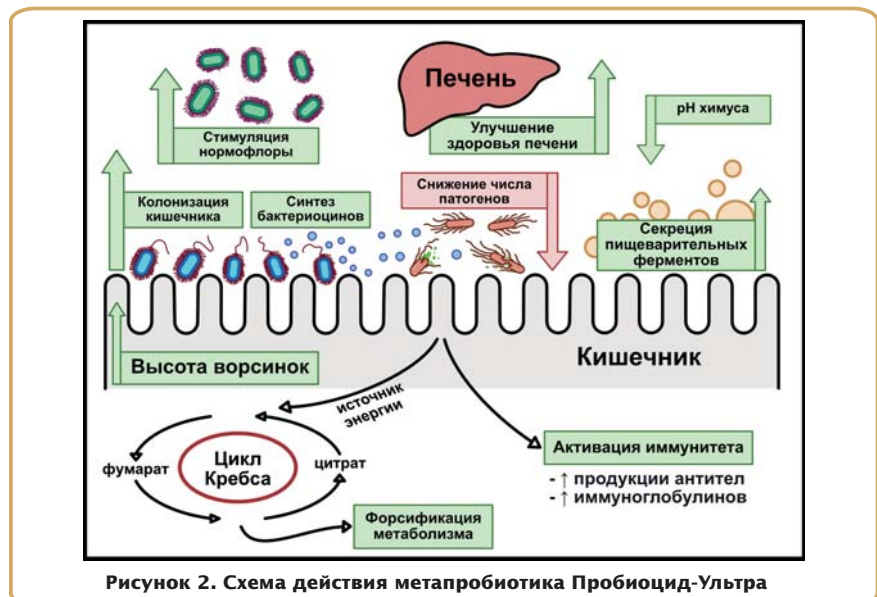


Рисунок 2. Схема действия метапробиотика Пробиоцид-Ультра





с антимикробными свойствами.

Активация метаболизма и иммунитета

Роль органических кислот и бактерий в составе Пробиоцид-Ультра многофункциональна. Так, например, известно, что короткоцепочечные жирные кислоты могут окисляться в организме птиц, являясь источником энергии, важной для клеток слизистой оболочки кишечника, что оказывает позитивное влияние на морфологию его эпителия. В частности, показано, что фумаровая кислота, как легкодоступный источник энергии, имеет сродство к слизистой оболочке тонкого кишечника и усиливает его абсорбционную поверхность за счет быстрого восстановления эпителиальных клеток [5].

Будучи промежуточными звеньями цикла Кребса, фумаровая и лимонная кислоты являются важным субстратом в метаболизме (рис. 2). Коллективом исследователей [6] было высказано утверждение о том, что введение в рацион лимонной и фумаровой кислот снижает разрушение тканей в результате глюконеогенеза и липолиза.

Известно, что фумаровая и лимонная кислоты повышают усвояемость питательных веществ и минералов и активируют работу ферментов. Так, показано, что введение в рацион цыплят лимонной кислоты увеличивало использование фитатного фосфора [7]. Включение 2% лимонной кислоты в соевый шрот было связано с увеличением у птицы активности α -галактозидазы [8].

В здоровом организме животных и птиц задачу противостояния патогенам должен выполнять иммунитет. Между тем, антибиотики не только не повышают, но и снижают иммунитет, делая организм более беспомощным и не способным к самозащите. Использование метапробиотиков в рационе птиц играет решающую

роль в регуляции иммунитета. Повышение иммунологического статуса связано со снижением экспрессии (работы) генов провоспалительных (инициирующих воспалительную реакцию) цитокинов, увеличением плотности лимфоцитов в лимфоидных тканях, нормализацией выработки гормонов щитовидной железы (Т3 и Т4), улучшением здоровья печени [9].

ФНЦ «ВНИТИП» РАН рекомендует

В условиях вивария подсобного хозяйства ФНЦ ВНИТИП РАН был проведен опыт по скармливанию метапробиотика Пробиоцид-Ультра цыплятам-бройлерам кросса Росс-308. При использовании препарата отмечено, что лимонная и фумаровая кислоты существенно улучшили вкусовые качества корма. Кислоты хорошо растворимы в слюне птицы, птица положительно реагировала на присутствие добавок в корме.

Как показали результаты опыта (рис. 3), применение кормовой добавки Пробиоцид-Ультра в рационах в количестве 1,3 кг/т комбикорма способствовало увеличению среднесуточного прироста бройлеров на 4,2% и улучшению конверсии корма на 5,7%.

Как видно из рис. 4, в опытной группе уровень гемоглобина в крови был выше, чем в контрольной, что может свидетельствовать о лучшей обеспеченности железом бройлеров, получавших Пробиоцид-Ультра. При недостатке железа у птицы могут появиться такие признаки, как вялость, потеря аппетита, медленный набор

живой массы.

Более низкий по сравнению с контролем показатель содержания общего билирубина в крови бройлеров, получавших Пробиоцид-Ультра, свидетельствует о позитивном влиянии препарата на процессы метаболизма, поскольку повышение данного показателя может указывать на В12-дефицитную анемию и интоксикацию организма.

У бройлеров контрольной группы наблюдалось снижение содержание общего белка в крови по сравнению с нормой (которая составляет 43-60 г/л). Обычно гипопроteinемия возникает при патологиях печени или почек, нарушении пищеварения, стрессе, недостатке питательных веществ, нарушении синтеза белка, мальабсорбции. Показатель содержания общего белка при скармливании Пробиоцида-Ультра стремился к норме, что свидетельствует о более интенсивном белковом обмене в опытной группе, нормализации процессов пищеварения и всасывания питательных веществ.

Кроме того, у бройлеров контрольной группы наблюдалась повышенная активность амилазы в крови по сравнению с опытной группой. Увеличение активности амилазы нередко наблюдается при заболеваниях поджелудочной железы, поражении слюнных желез, почечной недостаточности.

В молекулярно-биологическом центре НПК «БИОТРОФ» (рис. 5) было проведено NGS-секвенирование (next-generation

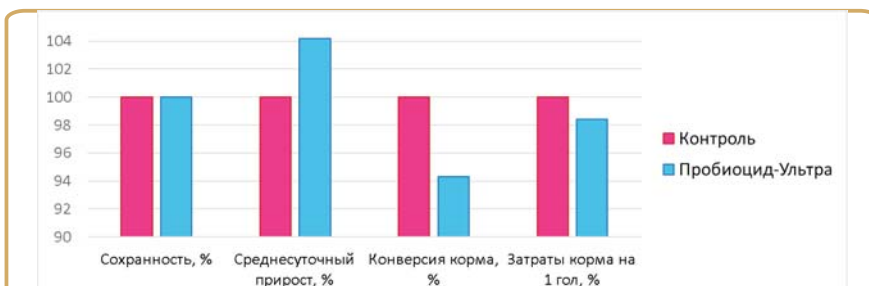


Рисунок 3. Основные зоотехнические показатели опыта на цыплятах-бройлерах

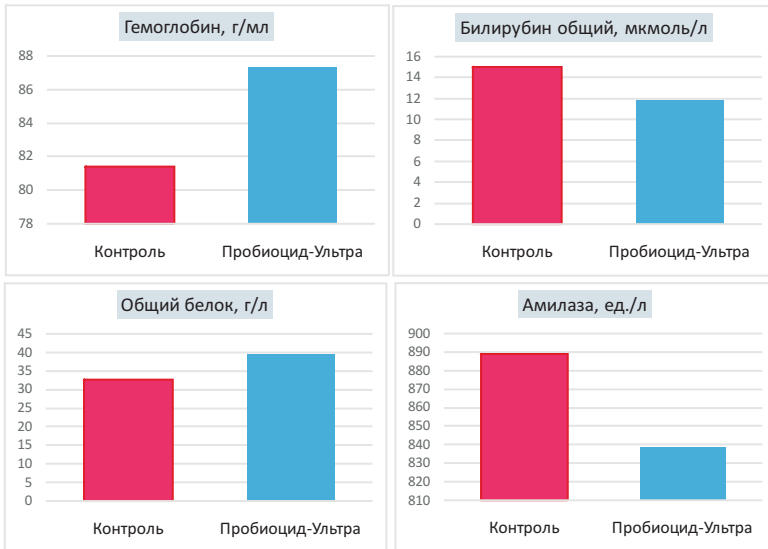


Рисунок 4. Результаты биохимического анализа крови бройлеров

sequencing) микробиома кишечника птиц, позволяющее выявлять точный состав 100% его микроорганизмов, включая некультивируемые и патогенные формы, идентифицировать их до вида даже в микроколичествах.

Оказалось (рис. 6), что Пробиоцид-Ультра оказывал регулирующее воздействие на состав микробиома, формируя стабильный нормоценоз с высоким содержанием полезной микробиоты и низким содержанием таких патогенов, как *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus cecorum*, *Streptococcus spp.*, *Pasteurellaceae*,

Campylobacter spp. и др.

Таким образом, улучшение зоотехнических показателей бройлеров при использовании Пробиоцид-Ультра было связано с форсификацией обменных процессов, активизацией пищеварения и восстановлением состава кишечного микробиома.

Сработал лучше антибиотика

На предприятии ОАО «Птицефабрика Зеленецкая» был проведен эксперимент в промышленном масштабе на бройлерах кросса Кобб-500: контрольная группа получала кормовой антибиотик

(нозигептид), в рационе опытной группы его полностью заменили на метапробиотик Пробиоцид-Ультра. Высокий уровень сохранности, как в опытной, так и в контрольной группе, обеспечивало прореживание поголовья.

Как показали результаты NGS-секвенирования, использование метапробиотика Пробиоцид-Ультра оказало выраженное влияние на модуляцию кишечной микробиоты цыплят. Так, в кишечнике увеличивалось (в 3,2 раза по сравнению с контролем) содержание полезных представителей нормобиоты семейства *Veillonellaceae*, которые играют ключевую роль в процессах метаболизма, синтезируя летучие жирные кислоты, в частности, бутират (рис. 7). Метапробиотик снижал содержание патогенов, в том числе опасного для птиц патогена *Enterococcus cecorum*, с которым не смог справиться даже кормовой антибиотик. *Ent. cecorum* на фоне дисбиозов кишечника способен вызывать различные заболевания опорно-двигательного аппарата, такие как спондилиты, некрозы головки бедренной кости, артриты и остео-



Рисунок 5. Молекулярно-генетическая лаборатория компании «БИОТРОФ», справа - NGS-секвенатор (Illumina, США)

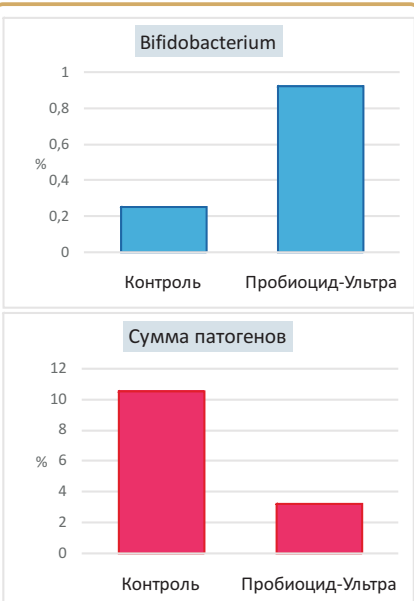


Рисунок 6. Состав микроорганизмов в кишечнике бройлеров, определенный методом NGS-секвенирования

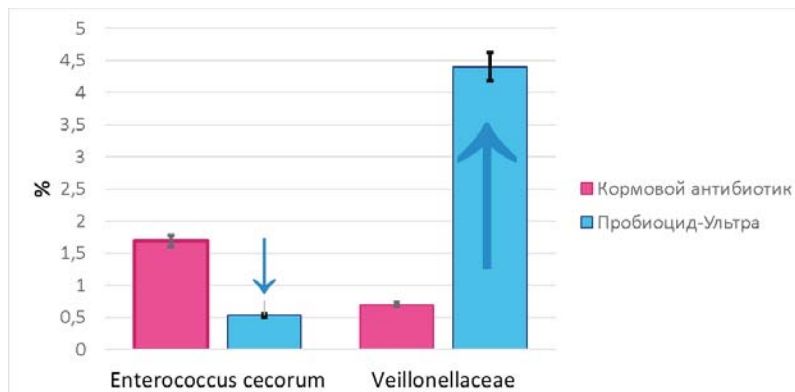


Рисунок 7. Содержание микроорганизмов в кишечнике птицы, определенное методом NGS-секвенирования

миелиты.

Логично, что введение в рацион препарата Пробиоцид-Ультра оказало более выраженное стимулирующее влияние на рост и развитие бройлеров по сравнению с применением кормового антибиотика, что выражалось в увеличении живой массы и сохранности поголовья (рис. 8). Для сравнения результатов использовали индекс продуктивности, который отражает такие важные показатели, как живая масса, сохранность и затраты кормов, и позволяет комплексно оценить влияние различных факторов на выращивание цыплят-бройлеров. В группе с применением метапробиотика индекс продуктивности возрос на

1,41 единицу по сравнению с кормовым антибиотиком.

Таким образом, Пробиоцид-Ультра способен полностью заменить в рационе бройлеров кормовые антибиотики.

Выводы

Свести к минимуму применение антибиотиков без ущерба для производителя мяса птицы и яиц возможно даже на крупных промышленных предприятиях с большой плотностью поголовья. В первую очередь, следует отказываться от антибиотиков, предназначенных для профилактических целей и стимуляции роста. Эту роль можно и нужно доверить безопасным альтернативным вариантам. Пред-

ставляется актуальным использование биопрепаратов, которые объединяют достоинства разных штаммов микроорганизмов и полезных бактериальных метаболитов в одном препарате для достижения синергического эффекта. Несколько компонентов метабиотика Пробиоцид-Ультра действуют разнонаправленно в отношении снижения количества патогенов, повышения резистентности организма птицы и форсификации процессов метаболизма, что обеспечивает улучшение здоровья и стимуляцию роста. Результат от применения такого препарата не уступает по производственной и экономической эффективности антибиотикам, но исключает негативные последствия от их использования, такие как аккумуляция в продукции, негативное воздействие на иммунитет и микробиоту кишечника.

Литература

1. Partanen K., Jalava T., Valaja J., Perttilä S., Siljander-Rasi H., Lindberg H. Effect of dietary carbadox or formic acid and fibre level on ileal and faecal nutrient digestibility and microbial metabolite concentrations in ileal digesta of the pig



Рисунок 8. Сравнительный анализ зоотехнических показателей бройлеров на фоне применения Пробиоцид-Ультра и кормового антибиотика (усредненные данные по 2 корпусам)

- // Anim. Feed Sci. Technol. - 2001. - V. 93. - P. 137-155.
2. Impey C.C., Mead G.C. Fate of salmonellas in the alimentary tract of chickens pre-treated with a mature caecal flora to increase colonization resistance // J. Appl. Bacteriol. - 1989. - V. 66, No 6. - P. 469-475.
3. García V., Catalá-Gregori P., Hernández F., Megías M.D., Madrid J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers // Br. Poult. Sci. - 2007. - V. 16. - P. 555-562.
4. Bearson B.L., Wilson L., Foster J.W. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress // J. Bacteriol. - 1998. - V. 180, No 9. - P. 2409-2417.
5. Blank R., Mosenthin R., Sauer W.C., Huang S. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early weaned pigs // J. Anim. Sci. - 1999. - V. 77. - P. 2974-2984.
6. Giesting D.W., Easter R.A. Response of starter pigs to supplementation of corn soybean meal diets with organic acids // J. Anim. Sci. - 1985. - V. 60. - P. 1288-1294.
7. Boling S.D., Webel D.M., Mavromichalis I., Parsons C.M., Baker D.H. The effects of citric acid on phytate phosphorus utilization in young chicks and pigs // J. Anim. Sci. - 2000. - V. 78. - P. 682-689.
8. Ao T. Exogenous enzymes and organic acids in the nutrition of broiler chicks: effects on growth performance and in vitro and in vivo digestion. Ph.D. Thes., Univ. of Kentucky, 2005.
9. Abdelrazek H.M.A., Abuzead S.M.M., Ali S.A., El-Genaidy H.M.A., Abdel-Hafez S.A. Effect of citric and acetic acid water acidification on broiler's performance with respect to thyroid hormones levels // Adv. Anim. Vet. Sci. - 2016. - V. 4. - P. 271-278.
10. McEwen S.A., Angulo F.J., Collignon P.J., Conley J. Potential unintended consequences associated with restrictions on antimicrobial use in food-producing animals. // WHO Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals. Geneva, WHO, 2017. Section 2.3. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK487949/)
- Для контакта с авторами:**
Йылдырым Елена Александровна
E-mail: deniz@biotrof.ru
Ильина Лариса Александровна
E-mail: ilina@biotrof.ru
Тюрина Дарья Георгиевна
E-mail: tiurina@biotrof.ru
Дубровин Андрей Валерьевич
E-mail: dubrowin.a.v@yandex.ru
Филиппова Валентина Анатольевна
E-mail: doumova@mail.ru
Новикова Наталья Ивановна
E-mail: natalia-iv-nov@rambler.ru
Большаков Владислав Николаевич
E-mail: bvn@biotrof.ru
Лаптев Георгий Юрьевич
E-mail: laptev@biotrof.ru
Манукян Вардгес Агавардович
E-mail: vard13@yandex.ru
Тарлавин Николай Владимирович
E-mail: tarlav1995@biotrof.ru
Меликиди Вероника Христофоровна
E-mail: veronika@biotrof.ru
Биконя Светлана Николаевна
E-mail: svetlana@biotrof.ru
Васильева Каролина Владимировна
E-mail: v.karolina@ro.ru



Metaprobiotics as an Alternative to Antibiotics

Yyldyrym E.A.¹, Ilyina L.A.¹, Tiurina D.G.¹, Dubrovin A.V.¹, Filippova V.A.¹, Novikova N.I.¹, Bolshakov V.N.¹,
Laptev G.Yu.¹, Manukyan V.A.², Tarlavin N.V.¹, Melikidi V.Kh.¹, Bikonya S.N.¹, Vasilyeva K.V.¹

¹BIOTROF, Ltd. (Saint-Petersburg); ²Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry" of Russian Academy of Sciences

Summary: The preparations based on the combination of probiotic microbial strains and their metabolites (e.g. low-molecular organic acids) can be an effective alternative to the antibiotics in commercial poultry production, as it is shown on the example of "Probiocid-Ultra" (BIOTROF, Russia) containing two *Bacillus* strains and natural bacterial metabolites (fumaric and citric acids). The synergism between these two basic ingredients was found: the preparation can effectively stimulate the growth of beneficial species within the intestinal microbiota (similarly to "classic" probiotics) and enhance the ability of the host to depress the growth of pathogens manifold due to the acidifying effect of the acids. Other effects on the host include enhancement of the resistibility, activation of endogenous enzymes, stimulation of the renewal of intestinal epithelial cells. "Probiocid-Ultra" acts as a therapeutic antibiotic (inhibiting the growth of pathogens) and antibiotic growth promoter (enhancing the productive performance), though in contrast to the antibiotics it does not mount the additional load on the immune system in poultry.

Key words: Probiocid-Ultra, acidifier, probiotic, intestinal microbiome, next-generation sequencing (NGS), broilers.