

# Новые пробиотики на основе геномных технологий

Лаптев Г.Ю., Ёылдырым Е.А., Новикова Н.И., Тюрина Д.Г., Ильина Л.А., Дубровин А.В., Филиппова В.А., Меликиди В.Х., Молотков В.В., Ахматчин Д.А., Калиткина К.А.

НПК «БИОТРОФ», Санкт-Петербург

В пищеварительной системе животных и птиц присутствует множество разнообразных микроорганизмов. Учеными установлено, что в здоровом организме микробиом представляет собой сложную и сбалансированную симбиотическую микроэкосистему с нормальными метаболическими свойствами. Основными функциями нормофлоры в организме хозяина являются выработка ферментов (целлюлаз, протеаз и др.), необходимых для пищеварения, участие в обмене веществ, защита организма от патогенов и токсинов, синтез органических кислот и витаминов, формирование иммунитета и др.

**Сверхважность применения пробиотиков.** Помимо нормофлоры, в кишечнике животных и птиц присутствуют микроорганизмы, представляющие угрозу здоровью, их называют условно-патогенными (энтеробактерии, актиномицеты и др.) и патогенными (клубки, ацинетобактерии, сальмонеллы, пастереллы и др.). В птицеводстве существует серьезная недооценка инфекционного потенциала кормов. Именно из-за высокой обсемененности кормов патогенные и условно-патогенные формы будут всегда присутствовать в здоровом организме. Пока микробиота кишечника и иммунитет в норме, то проблем с этими группами не возникает, их содержание находится на низком

уровне, однако в случае снижения резистентности происходят нарушения микроэкологии кишечника – дисбиозы. Возникновение дисбиозов провоцируют такие стрессовые ситуации, как погрешности в кормлении птицы, некачественные корма, ксенобиотики, смена рациона, вакцинации, скученность поголовья и пр.

На фоне дисбиозов у птицы наблюдаются иммунные расстройства, нарушается обмен веществ, в разы увеличивается подверженность вирусным инфекциям, нарушается пищеварение, что наносит удар по продуктивности и сроку хозяйственного использования. При снижении иммунитета патогенные и условно-патогенные бактерии активно колонизируют слизистую эпителия кишечника, вырабатывая разнообразные механизмы штурма и выживания в организме. Они начинают синтез ряда агрессивных ферментов и широкого спектра токсинов, которые являются факторами вирулентности. Скоординированное действие ферментов и токсинов вызывает изменения проницаемости мембран эпителиальных клеток кишечника, некроз и апоптоз (гибель клеток). Повреждения эпителия кишечника приводят к проникновению патогенов и продуктов их жизнедеятельности в кровоток. Возникшая септицемия может вызывать

у птицы целый ряд серьезных заболеваний.

Давно известно, что селекция штаммов микроорганизмов для создания по-настоящему эффективных пробиотиков должна базироваться на выявлении бактерий с высоким уровнем антагонизма по отношению к патогенам, способностью стимулировать рост нормофлоры, синтезировать пищеварительные ферменты, аминокислоты и витамины, осуществлять биодеструкцию ксенобиотиков (микотоксинов, пестицидов). В последние годы, благодаря широким научным разработкам, была создана современная концепция, которая позволила выявить новые молекулярные механизмы действия полезных микроорганизмов на основе регуляции экспрессии (активности) генов организма хозяина.

Эта новая концепция легла в основу разработки в НПК «БИОТРОФ» многофункциональных пробиотиков, которые не только восстанавливают микробиом и подавляют патогены, но и повышают иммунитет, снижают активность генов апоптоза и воспаления, защищая целостность кишечника, улучшают состояние здоровья и увеличивают продуктивность хозяина.

**Новое слово в разработке.** Селекция штаммов с целью создания пробиотиков традиционно проводится с использованием



ПРОФОРТ-Т ПОСРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ :

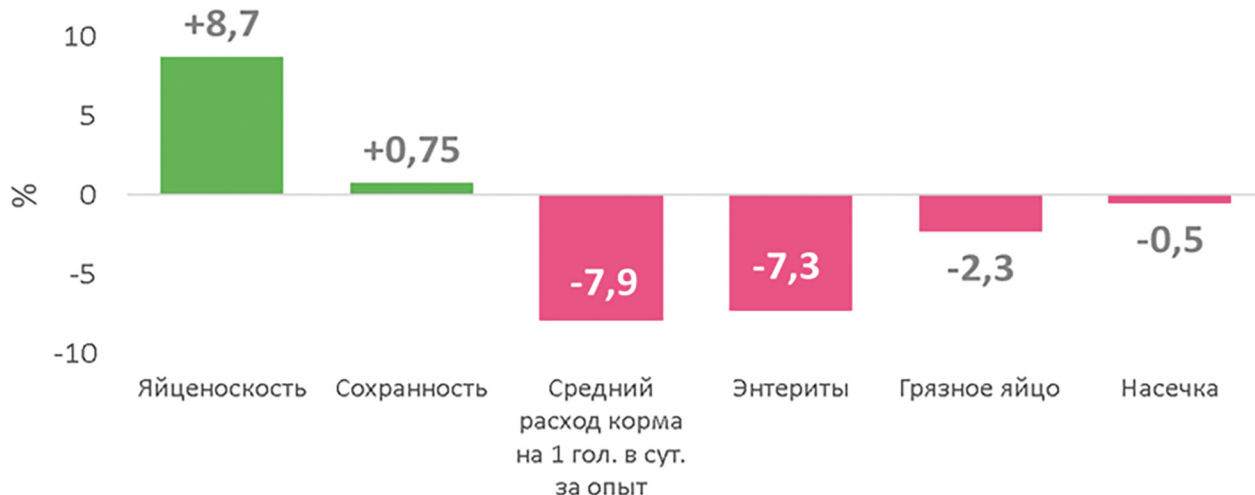


Рисунок 1. Эффективность использования пробиотика Профорт-Т на поголовье яичной птицы в условиях яичной птицефабрики



классических методов микробиологии. В последние годы в НПК «БИОТРОФ», в связи со стремительным ростом научных знаний, селекция перспективных штаммов основывается, прежде всего, на технических достижениях в области молекулярной биологии. Основой создания пробиотиков нового поколения является инновационный метод полногеномного секвенирования, разработанный учеными центра молекулярно-генетических исследований. Этот метод позволяет на молекулярном уровне оценить регуляторные свойства, механизмы действия и биологический потенциал штаммов. Самым важным аспектом является то, что метод дает возможность предсказать возможные взаимодействия штамма микроорганизма с хозяином, оценить уровень влияния на экспрессию генов и его метаболизм. Применение этого метода позволяет ученым НПК «БИОТРОФ» на этапе разработки биопрепарата выявлять штаммы с уникальными характеристиками, оценить весь

спектр возможностей и конкурентоспособность пробиотических бактерий при попадании в кишечник хозяина. Этого не может предложить ни одна из компаний, занимающаяся распространением пробиотиков в России.

На основе таких технологий в НПК «БИОТРОФ» был разработан ряд инновационных пробиотических препаратов, каждый из которых имеет масштабное научное досье, обосновывающее дифференцированное управление микробными представителями нормофлоры и другие полезные свойства.

**Повысить продуктивность.**

В результате многолетней работы в компании «БИОТРОФ» появилась новинка – многокомпонентный пробиотик Профорт-Т на основе смеси штаммов микроорганизмов *Bacillus* sp. (видовая принадлежность не раскрывается, т.к. составляет коммерческую тайну). Благодаря использованию метода полногеномного секвенирования при разработке биопрепарата Профорт-Т удалось полу-

чить штаммы бактерий с уникальными метаболическими возможностями по сравнению с аналогичными видами. Около 30% генома каждого штамма связано с пробиотической активностью, поэтому они гораздо активнее и производительнее других родственных штаммов.

Важной производственной характеристикой штаммов бацилл в составе биопрепарата Профорт-Т, по сравнению с лактобактериями и другими штаммами бацилл, является их усиленный уровень термостабильности и стопроцентная выживаемость при термической обработке кормов. Еще одним существенным преимуществом является то, что штаммы *Bacillus* sp. в составе пробиотика имеют повышенную выживаемость в агрессивной среде пищеварительной системы, а благодаря гидрофобности их споры эффективно «прилипают» к эпителию кишечника. Это позволяет бактериям выстилать и колонизировать поверхность слизистой кишечника. После завершения



адгезии (прикрепления) бактерии начинают активно выделять экзополисахариды, заполняющие межклеточное пространство, что обеспечивает устойчивость к действию повреждающих физико-химических факторов, а также защищает эпителий.

Результаты многочисленных опытов, проведенных на птице, доказали безусловную эффективность применения данного био-препарата, значительно превышающую эффективность других пробиотиков.

Так, применение пробиотика Профорт-Т на поголовье несушек на одной из крупных яичных птицефабрик способствовало увеличению яйценоскости на 8,7% (рис. 1). Средний расход корма на 1 голову в сутки за период опыта снизился на 7,9%.

Применение пробиотика приводило к снижению таких проблем, связанных с пищеварением, как энтериты и загрязнение скорлупы яиц. Это достигалось несколькими путями: во-первых, происходило подавление патогенной микрофлоры благодаря синтезу сильнейших антимикробных факторов. Во-вторых, происходила непосредственная стимуляция роста нормофлоры и образование с ней симбиотических связей. В-третьих, в результате применения препарата увеличилось высвобождение питательных веществ корма, их переваримость и всасываемость, снижалась вязкость химуса и количество в нем патогенов. Кроме того, пробиотик защищал кишечные эпителиальные клетки от повреждения, способствовал поддержанию кишечного гомеостаза.

**Решение проблемы клостридиоза.** Одна из наиболее

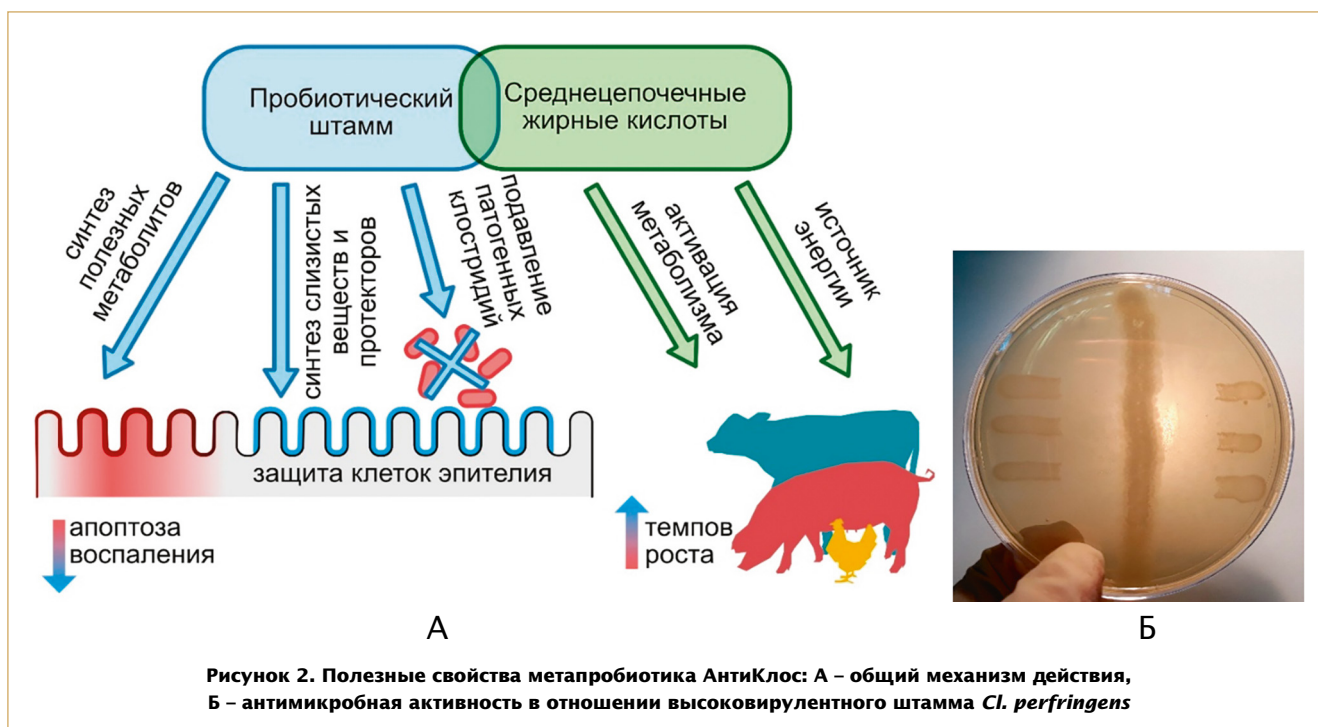
значимых проблем птицеводства, которая приводит к разрушительным экономическим последствиям – это некротические энтериты, вызываемые патогенными видами рода *Clostridium*, вспышки которых происходят на многих птицефабриках европейских стран после запрета кормовых антибиотиков. В России *Cl. perfringens*, еще до вступления в силу аналогичного закона, уже диагностировался у 80% стад, что связано с принятой в нашей стране масштабом птицефабрик, значительной скученностью поголовья, сверхпродуктивностью, отсутствием профилактических вакцин.

Как известно, основными факторами вирулентности патогенных клостридий являются образующие ими токсины. Однако попытки сорбции токсинов клостридий из просвета ЖКТ при помощи сорбентов слабо обоснованы с научной точки зрения. Это объясняется большим размером молекул клостридиальных токсинов – 60-300 кДа, что несопоставимо с размерами пор сорбентов; по размеру и по структуре токсины клостридий во многом напоминают ферменты. Для сравнения, трихотеценовые микотоксины (ДОН, Т-2), поддающиеся сорбции при помощи некоторых препаратов, имеют молекулярную массу менее 1 кДа.

Диагностика возбудителей клостридиозов затруднена, поскольку патогенные клостридии, включающие такие виды, как *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Cl. difficile* и ряд других – это постоянные обитатели пищеварительной системы животных и птиц. Клостридии попадают в ЖКТ вертикальным путем – от родителей

к потомству, а также из окружающей среды: корма, фекалий, подстилки, воды и т.д. Однако любой фактор, который оказывает влияние на ЖКТ, будь то неблагоприятный состав рациона или повреждение эпителия пищеварительной системы, вызванное кокцидиальными патогенами или микотоксинами кормов, является фактором риска увеличения численности патогенных клостридий в кишечнике выше порогового уровня.

Дополнительной сложностью, затрудняющей диагностику, является то, что инфекция может проявляться не только как острое клиническое, но и как субклиническое заболевание. Острая форма заболевания проявляется яркой симптоматикой: так, например, у птиц отмечают депрессию, оперение становится взъерошенным, появляется диарея. Всплеск падежа бройлерного стада может достигать 50%. Однако клиническая форма достаточно легко диагностируется и встречается довольно редко. Мировые исследования показали, что наибольшие потери продуктивности (около 12%) связаны с субклинической формой некротического энтерита. Скорее всего, экономическая значимость этого патогена недооценена, поскольку при доминировании субклинической формы масштабы потерь оценить очень трудно. Субклинический клостридиоз протекает скрыто, маскируясь за другие заболевания, кормовые и технологические нарушения. Так, в птицеводстве единственным наблюдаемым признаком является специфическая задержка роста цыплят в возрасте 2-3 недель. Как полагают, это связано с «окном» в антиклостридиальном



иммунитете цыплят. Это «окно» «открывается», когда титры материнских антител уже снизились, а собственная иммунная система цыплят еще не достигла зрелости. Еще одним признаком может являться влажная подстилка, что вызывает увеличение случаев поражений подушечек лап и/или скакательных суставов.

Здоровый профиль микробиоты пищеварительной системы и защищенный эпителий кишечника – это основные факторы, способные противостоять клостридиозам.

Новый метапробиотик АнтиКлос (НПК «БИОТРОФ»), разработанный на основе применения метода полногеномного секвенирования – это биопрепарат, действие которого направлено, прежде всего, на профилактику клостридиозов животных и птиц. В его состав входят пробиотические бактерии, дополнительно обогащенные полезными бактериальными метаболитами (сред-

нецепочечными органическими кислотами), которые, благодаря синергическому эффекту, результативно модулируют состав микробиома пищеварительной системы (рис. 2).

Пробиотические бактерии в составе биопрепарата АнтиКлос обладают выраженным антагонизмом по отношению к клостридиям (рис. 2Б) и колонизационной резистентностью благодаря высокой эффективности адгезии (прикрепления) к клеткам кишечного эпителия. Эти свойства реализуется за счет комплекса механизмов: выделения антибактериальных веществ, включая бактериоцины, органические кислоты, экзоферменты, лизоцим, полисахариды и др. Благодаря широким метаболическим возможностям АнтиКлос обладает высоким уровнем антимикробной активности в отношении других кишечных патогенов, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Fusobacterium necrophorum*,

*Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* и др.

Помимо мощного антимикробного эффекта, биопрепарат оказывает многостороннее действие на организм хозяина (рис. 2А). Дело в том, что высокоактивные бактерии в составе биопрепарата синтезируют широкий спектр метаболитов, оказывающих протекторное действие на основные мишени клостридий. Они защищают клетки от повреждений, снижают уровень экспрессии (активности) генов апоптоза и воспаления. Бактерии в составе препарата являются слизиобразующими. Слизь служит дополнительным рубежом защиты эпителия кишечника от токсинов клостридий и способствует быстрому заживлению некротических поражений.

Жирные кислоты со средней длиной углеводородной цепи, входящие в состав препарата АнтиКлос, многофункциональны. Они обладают антимикробной ак-



тивностью, а также могут окисляться в организме животных и птиц, являясь источником энергии, важной для клеток слизистой оболочки кишечника. Эти кислоты восстанавливают морфологию эпителия, нарушенную клостридиями, повышают усвояемость питательных веществ и минералов, активируют работу ферментов. Это приводит к увеличению усвояемости кормов и росту продуктивности.

В здоровом организме животных и птиц задачу противостояния клостридиям должен выполнять иммунитет. Между тем, антибиотики не только не повышают, но и снижают иммунитет, делая организм более беспомощным и неспособным к самозащите. Использование метапробиотика АнтиКлос в рационе играет решающую роль в регуляции иммунитета.

Давно доказано, что кормовые факторы оказывают значительное влияние на клостридозы. Рационы с высоким содержанием водорастворимых некрахмалистых полисахаридов способны связывать большое количество воды. Это вызывает увеличение вязкости химуса (содержимого) кишечника и влечет за собой снижение переваримости, а также скорости всасывания питательных веществ. Высокая вязкость химуса кишечника замедляет скорость прохождения корма по пищеварительной системе. В результате ухудшается здоровье кишечника и нарушается баланс микробиоты, что способствует развитию патогенов, включая клостридий. По этой причине действие метапробиотика АнтиКлос против клостридий не ограничивается только антимикробными свойствами. Другой фактор, участвующий в подавлении

клостридий – синтез целлюлозолитических ферментов. Эти ферменты участвуют в переваривании клетчатки в ЖКТ хозяина и оптимизации процесса усвоения питательных веществ, что обеспечивает профилактику повышения вязкости химуса. Ферменты, продуцируемые пробиотическими бактериями – это один из самых эффективных способов доставки их в кишечник, а, значит, наиболее эффективный метод преодоления негативного воздействия вязкости химуса на здоровье животных и птиц. Ферментные комплексы штамма бактерии в составе метапробиотика АнтиКлос, в отличие от чистых единичных ферментов, воздействуют на различные компоненты структурной клетчатки корма (целлюлозу, гемицеллюлозу и пр.), причем как растворимые, так и нерастворимые.

Таким образом, с одной стороны, АнтиКлос подавляет патогенную микрофлору, прежде всего, клостридии, с другой стороны, стимулирует увеличение продуктивности, подобно кормовым антибиотикам. При этом, в отличие от антибиотиков, этот препарат не создает дополнительную нагрузку на ослабленный иммунитет.

**Заключение.** В последние годы в НПК «БИОТРОФ» для селекции перспективных штаммов бактерий разработан и активно применяется метод полногеномного секвенирования, что позволило создавать самые высококачественные пробиотические композиции. Благодаря использованию данного метода был создан биопрепарат Профорт-Т, содержащий штаммы бактерий с уникальными метаболическими

возможностями по сравнению с аналогичными видами бактерий, продуцирующие множество ценнейших биологически активных веществ. Поэтому препарат способен оказывать многостороннее действие как на микробиом, так и на организм хозяина, регулируя работу многих органов и систем. Комплексный метапробиотик АнтиКлос, объединяющий комбинацию пробиотических бактерий и среднепечочных жирных кислот, отличается высоким уровнем антиклостридиальной активности и разнообразием других полезных свойств. Высокоактивные компоненты биопрепарата оказывают выраженное протекторное действие на пищеварительную систему, снижают воспаление, повышают общую резистентность организма.

#### **Для контакта с авторами:**

**Лаптев Георгий Юрьевич**

**E-mail: laptev@biotrof.ru**

**Йылдырым**

**Елена Александровна**

**E-mail: deniz@biotrof.ru**

**Новикова Наталья Ивановна**

**E-mail: novikova@biotrof.ru**

**Тюрина Дарья Георгиевна**

**E-mail: tiurina@biotrof.ru**

**Ильина Лариса Александровна**

**E-mail: ilina@biotrof.ru**

**Дубровин Андрей Валерьевич**

**E-mail: dubrovin@biotrof.ru**

**Филиппова**

**Валентина Анатольевна**

**E-mail: filippova@biotrof.ru**

**Меликиди**

**Вероника Христофоровна**

**E-mail: veronika@biotrof.ru**

**Молотков**

**Виталий Владимирович**

**Ахматчин Дмитрий Андреевич**

**E-mail: da@biotrof.ru**

**Калиткина Ксения Андреевна**