

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01– Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
**ВЛИЯНИЕ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* GM5 НА
ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ СЛЕПОГО КИШЕЧНИКА
ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ**

Студент 4 курса

Группы 01-604

«25» мая 2020г.



(А.А. Николаева)

Научный руководитель

Доцент, к.б.н.

«26» мая 2020г.



(А.М.Марданова)

Заведующая кафедрой
д.б.н. (профессор)

"1" июня 2020г.



(О.Н. Ильинская)

Казань-2020

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Пробиотики как препараты для лечения и профилактики дисбактериозов	7
1.1.1. Общая характеристика пробиотиков	7
1.1.2 Проблема использования в птицеводстве антибиотиков	10
1.1.3. Пробиотики в промышленном птицеводстве	13
1.1.4. Пробиотики на основе бактерий рода <i>Bacillus</i>	14
1.2 Ферменты в качестве пищевых добавок птицеводстве	18
1.2.1. Фитазы в птицеводстве	18
1.2.2 Протеазы в птицеводстве	22
1.3. Метагеномные исследования микробных сообществ	24
1.3.1 Общие принципы метагеномных исследований	24
1.3.2 Метагеномный анализ микробиоты кишечника птиц	30
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	36
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1. Объект исследования	36
2.2 Питательные среды и условия культивирования	36
2.3. Исследование влияния <i>B. subtilis</i> GM2 и GM5 на цыплят-бройлеров	37
2.4. Отбор образцов, выделение ДНК и секвенирование 16S рРНК	38
2.5 Исследование влияния <i>B. subtilis</i> GM5 и фитазы и протеазы на цыплят-бройлеров	39
2.4. Микробиологический анализ содержимого ЖКТ цыплят-бройлеров	39
2.7. Статистическая обработка результатов	39
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1. Исследование влияния <i>B. subtilis</i> GM2 и GM5 на прирост и потребление кормов цыплят-бройлеров кросса Кобб-500	40

3.2. Таксономическая структура микробиоты слепого кишечника цыплят-бройлеров на основе метагеномных данных	42
3.3. Влияние кормовых добавок на основе спор <i>B. subtilis</i> GM5 на микробиом слепой кишки цыплят-бройлеров	44
3.4. Микробиологический анализ содержимого ЖКТ цыплят-бройлеров, получавший бактериальные и ферментные добавки	48
ВЫВОДЫ	51
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	52

ВВЕДЕНИЕ

Внутренняя и внешняя среда всех организмов заселена бактериями [Bell *et al.*, 2018]. Самое большое их разнообразие обнаружено в желудочно-кишечном тракте, где они принимают важное участие в жизнедеятельности особи [Markowiak *et al.*, 2018]. В течение онтогенеза в кишечнике животного образуется сбалансированная бактериальная экосистема благодаря биотическим взаимодействиям между различными бактериями [Trosvik *et al.*, 2015]. Влияние кишечного микробиома на метаболизм и физиологию хозяина выходит за пределы кишечника: он влияет и на такие отдаленные органы, как печень, мышцы и мозг. Это позволяет рассматривать кишечный микробиом как новый орган [Lustgarten, 2019; Tu *et al.*, 2020], который, как и любой другой, реагирует на раздражители окружающей среды [Hughes, 2020]. Таким образом, модуляция кишечной микрофлоры является одновременно и индикатором, и одним из способов регуляции жизнеспособности животных.

Согласно некоторым моделям население Земли достигнет пика в почти 10 миллиарда человек в 2050 году [Huws *et al.*, 2018]. Динамичный рост населения сопровождается ростом потребности в продуктах питания, что также связано с повышением стандартов их качества и производительности. По этой причине исследователи ищут решения проблемы интенсификации производства продовольствия и снижения производственных затрат [Markowiak *et al.*, 2018]. Одной из актуальных проблем является подверженность сельскохозяйственных животных стрессам, в том числе связанным с неудовлетворительными условиями содержания и питанием, что может привести к дисбалансу кишечного микробиома, и, как следствие, к риску патогенных инфекций, приводящих к снижению продуктивности животноводства, загрязнению пищевых продуктов и потенциальному риску зоонозов [Truszczyński *et al.*, 2006].

В ветеринарии и птицеводстве в качестве кормовых добавок для стимулирования роста животных и предотвращения инфекционных заболеваний широко используются антибиотики [Zhang *et al.*, 2020]. Однако

их длительное использование привело к развитию устойчивых к противомикробным препаратам патогенов, являющихся потенциальной угрозой для здоровья потребителей и неблагоприятно влияющих на внешнюю среду [Ma *et al.*, 2018]. Альтернативой антимикробным средствам в качестве кормовых добавок являются пробиотики, способные подавлять рост болезнетворных микроорганизмов через продуцируемые метаболиты или посредством антагонистических отношений. Все большее количество исследований указывают на прямое или косвенное действие пробиотических средств на микрофлору кишечника. Тем не менее, отсутствует четкое понимание взаимодействия микроорганизмов с хозяином и его иммунитетом. Исследование механизмов действия пробиотиков необходимо для разработки оптимальных стратегий их приема для улучшения здоровья желудочно-кишечного тракта животных и повышения продуктивности. Это обуславливает беспрецедентное внимание исследователей к проблеме формирования и функционирования микробиома кишечника [Tu *et al.*, 2020].

Цель работы: характеристика влияния кормовых добавок на основе спор штамма *Bacillus subtilis* GM5 и ферментов фитазы и протеазы на прирост бройлеров и состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Оценка влияния штаммов *B. subtilis* GM2 и GM5 на прирост и потребление кормов цыплят-бройлеров кросса Кобб-500.
- 2) Метагеномный анализ микробного сообщества слепого кишечника цыплят бройлеров на 42 сутки роста.
- 3) Оценка влияния штамма *B. subtilis* GM5 на микрофлору слепого кишечника цыплят бройлеров.
- 4) Микробиологический анализ влияния кормовой добавки на основе штамма GM5, фитазы и протеазы на микрофлору тонкой и слепой кишки цыплят бройлеров.

ВЫВОДЫ

- 1) Применение пробиотической добавки на основе спор *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 приводит к повышению прироста живой массы цыплят-бройлеров на 4.16% и 10.76% относительно контроля.
- 2) Преобладающими бактериями в микробиоте слепого кишечника цыплят-бройлеров на 42 сутки являются представители филумов *Firmicutes* (54.55%) и *Bacteroidetes* (30.45%), преимущественно представленных семействами *Ruminococcaceae* и *Bacteroidaceae* соответственно.
- 3) Метагеномный анализ показал, что пробиотик на основе штамма *Bacillus subtilis* GM5 приводит к увеличению в слепой кишке доли *Firmicutes* на 27% и уменьшению *Bacteroidetes* 19%, а также снижению количества представителей семейства *Enterobacteriaceae* относительно контрольной группы.
- 4) Применение пробиотика на основе спор *B. subtilis* GM5 и ферментного комплекса фитазы и протеазы приводит к увеличению количества молочно-кислых бактерий в содержимом слепого кишечника в 10 раз и уменьшению ОМЧ в 3 раза относительно контроля.