

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 (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА

BACILLUS SUBTILIS GM5

Обучающийся 2 курса

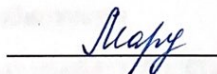
группы 01-040-2



А.А. Николаева

Научный руководитель

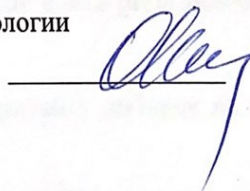
д-р биол. наук, доцент



А.М. Марданова

Заведующий кафедрой микробиологии

д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
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 антибиотиков в птицеводстве	9
1.1.3 Пробиотики в промышленном птицеводстве	12
1.1.4. Пробиотики на основе бактерий рода <i>Bacillus</i>	14
1.2. Метагеномные исследования микробных сообществ	18
1.2.1 Общие принципы метагеномных исследований	18
1.2.2 Метагеномный анализ микробиоты кишечника птиц	20
1.3. Взаимодействие пробиотиков с тканями и клетками кишечника	26
1.3.1 Эпителий кишечника и влияние на него пробиотиков	26
1.3.2. Иммунная система кишечника и ее взаимодействие с пробиотиками	29
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	32
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1 Объекты исследования	32
2.2 Питательные среды и условия культивирования	33
2.3 Анализ устойчивости к антибиотикам	33
2.4 Исследование агрегационных свойств <i>Bacillus</i>	33
2.4.1. Анализ аутоагрегационной и коагрегационной активности	33
2.4.2. Световая микроскопия	34
2.5 Исследование влияния кормовых добавок на основе спор <i>B. subtilis</i> GM5 на цыплят-бройлеров	35
2.6 Отбор образцов, выделение ДНК и секвенирование 16S рРНК	35
2.7. Влияния кормовой добавки на основе спор <i>B. subtilis</i> GM5 на экспрессию генов в тканях слепого кишечника цыплят-бройлеров	36
2.8 Статистическая обработка результатов	38
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	39
3.1 Анализ устойчивости к антибиотикам штаммов <i>Bacillus</i>	39

3.2 Исследование агрегационных свойств <i>Bacillus</i>	40
3.2.1. Аутоагрегационная активность <i>Bacillus</i>	40
3.2.2 Коагрегационная активность <i>Bacillus</i>	43
3.3 Исследование влияния <i>B. subtilis</i> GM5 на прирост и потребление кормов цыплят-бройлеров кросса Росс-308	46
3.4 Влияние кормовых добавок на основе спор <i>B. subtilis</i> GM5 на микробиом слепой кишки цыплят-бройлеров	48
3.4.2. Альфа- и бета-разнообразие бактериальных сообществ слепого кишечника цыплят на 35 сутки роста	56
3.5 Влияния кормовой добавки на основе спор <i>B. subtilis</i> GM5 на экспрессию генов в тканях слепого кишечника цыплят-бройлеров	59
ВЫВОДЫ	62
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	63

HVR – hypervariable region, гипервариабельный участок

IgA – иммуноглобулин А

ITS – internal transcribed spacer

LB – lysogeny broth

NUS – next generation sequencing, секвенирование нового поколения

NSP – non-starch polysaccharides, некрахмальные полисахариды

OD – optical density, оптическая плотность

PBS – phosphate buffered saline

P_i – пирофосфат

PRR – pattern recognition receptors, рецепторы опознавания паттерна

SCFA – short-chain fatty acids, короткоцепочечные жирные кислоты

TJ – tight junctions

ВВЕДЕНИЕ

Динамичный рост населения Земли коррелирует с увеличением потребности в продуктах питания, что связано с поиском решения проблемы интенсификации производства продовольствия [Markowiak *et al.*, 2018]. Мясо птицы относится к наиболее употребляемым продуктам животного происхождения, спрос на потребление которых растет с ростом и урбанизацией населения [Peralta-Sánchez *et al.*, 2019]. Неудовлетворительные условия содержания и питания приводят к дисбалансу микробиома кишечника, и, как следствие, высокому риску инфекций, которые снижают продуктивность животноводства и являются потенциальным риском зоонозов [Mahmood *et al.*, 2020].

Антибиотические средства широко используются для профилактики инфекций в птицеводстве [McEwen, Fedorka-Cray, 2002]. По данным ВОЗ, резистентность к антибактериальным препаратам – всемирная проблема, на которую влияет использование антибиотиков как в медицине, так и в ветеринарии. Классы антибиотиков, которые используются в животноводстве и в медицине, в основном одни и те же, что увеличивает риск появления и распространения устойчивых бактерий, в том числе и патогенных [World Health Organization; 2018]. Животные являются одним из резервуаров патогенов, устойчивых к антибиотическим средствам, в связи с чем распространение генов устойчивости от бактерий животных к патогенам человека является еще одной потенциальной опасностью. Помимо использования антимикробных средств для лечения болезней животных, антибактериальные препараты используются также в сублетальных концентрациях в качестве стимуляторов роста, что увеличивает вероятность появления резистентных бактерий [McEwen, Fedorka-Cray, 2002; World Health Organization; 2018].

Пробиотики, как компонент современного рационального питания, находят широкое применение в птицеводстве, что связано с решением таких

проблем, как профилактика инфекционных заболеваний, повышение продуктивности животных, стимуляция роста, улучшение потребления питательных веществ. Введенные пробиотические культуры взаимодействуют с бактериальным сообществом кишечника через выделение метаболитов, а также напрямую или косвенно действуют на иммунную, пищеварительную и гормональную системы организма-хозяина [Ушакова с соавт., 2012].

Для разработки оптимальных стратегий приема пробиотических средств необходимо не только понимание механизмов их работы, особенно с учетом влияние на эффективность штаммоспецифичности действия, но и понимание формирования и функционирования микробиома желудочно-кишечного тракта [Griggs *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2009].

Целью работы является характеристика пробиотических свойств штамма *Bacillus subtilis* GM5.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Оценка устойчивости штамма *B. subtilis* GM5 к антибиотикам.
- 2) Оценка аутоагрегационных и коагрегационных свойств *B. subtilis* GM5.
- 3) Оценка влияния штамма *B. subtilis* GM5 на прирост и конверсию корма цыплят-бройлеров кросса Росс-308.
- 4) Оценка влияния штамма *B. subtilis* GM5 на микробиоту слепого кишечника цыплят бройлеров на 35 сутки роста.
- 5) Оценка влияния штамма *B. subtilis* GM5 на экспрессию генов белков плотного контакта и муцина в слепом кишечнике цыплят на 35 сутки роста.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ ИСТОЧНИКОВ ВЫВОДЫ

- 1) Штамм *B. subtilis* GM5 устойчив к тетрациклину и клиндамицину, проявляет промежуточную устойчивость к эритромицину и ципрофлоксацину и чувствителен к ампициллину, гентамицину, ванкомицину, хлорамфениколу.
- 2) Штамм *B. subtilis* GM5 показывает средний фенотип аутоагрегации ($53.3 \pm 1.6\%$ на 24 час инкубации) и активно коагрегирует с *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*.
- 3) Применение пробиотической добавки на основе спор *B. subtilis* GM5 приводит к повышению прироста живой массы цыплят-бройлеров и конверсии корма на 19.48% и 12.2% соответственно относительно контроля.
- 4) Метагеномный анализ показал, что пробиотик на основе штамма *B. subtilis* GM5 приводит к уменьшению в слепой кишке цыплят-бройлеров доли *Firmicutes* и увеличению *Bacteroidetes*, а также увеличивает биоразнообразие бактериальной микробиоты.
- 5) Применение пробиотика приводит к увеличению экспрессии гена адгезивного белка JAM2 в 8.4 раза и уменьшению экспрессии гена клаудина-1 (CLDN1) в 4.8 раз относительно контроля. Уровень экспрессии гена цитоплазматической пластинки ZO1 и гена основного секреторного муцина (MUC2) оставался на уровне контроля.