



FUNKČNÍ VZOREK

Vliv složení krmné směsi na skladbu střevní mikroflóry

**doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D.
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.**

Funkční vzorek 3458/2017

Vliv složení krmné směsi na skladbu střevní mikroflóry

Autoři

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D.
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

ISBN 978-80-86895-99-4

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1610219 Využití střevní mikroflóry pro zvýšení přirozené rezistence masných typů kura domácího k infekcím bakteriálními patogeny a s podporou projektů AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01, RVO 0517.

2017

1.	Úvod	3
2.	Předmět funkčního vzorku	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku	3
	<i>3.1 Skladba krmných směsí</i>	3
	<i>3.2 Sekvenační analýza genů pro 16S rRNA</i>	4
	<i>3.3 Vliv přídatku píce na složení střevní mikroflóry</i>	4
4.	Srovnání „novosti postupů“	8
5.	Uplatnění funkčního vzorku	8
6.	Ekonomické aspekty	8
7.	Seznam použité související literatury	8
8.	Dedikace	9

1. Úvod

Zdravotní stav zvířat hraje klíčovou roli v podmínkách intenzivního chovu drůbeže a je nezbytným předpokladem pro vysokou produkci. V souvislosti s tím je patrná snaha o kontrolu celého výrobního procesu od rozmnožovacích chovů přes líheň, odchov, výkrmu a až po zpracování na porážce tj. až po okamžik, kdy se potravina dostává ke konečnému spotřebiteli.

Jedním ze způsobů, jak ovlivnit zdravotní stav drůbeže v komerční produkci, a tím i následně kvalitu drůbežích produktů, je poskytnout zvířatům krmivo o optimálním složení. Je žádoucí, aby cílená modifikace krmných směsí přispěla ke zlepšení zdravotního stavu hejna, účinnější konverzi krmiva, vyšší porážkové hmotnosti a v neposlední řadě také ke snížení vstupních nákladů na krmiva. Vhodné složení krmných směsí může také v pozitivním smyslu ovlivňovat skladbu střevní mikroflóry drůbeže.

Mikroflóra trávicího traktu zásadním způsobem ovlivňuje chování svého hostitele. Střevní mikroflóra ovlivňuje degradaci součástí potravy, které hostitel sám nedokáže metabolizovat [1]. Baktérie střevní mikroflóry poskytují svému hostiteli růstové faktory jako např. vitamíny nebo poskytují střevním epitelialním buňkám kyselinu máselnou (butyrát), což je preferovaný zdroj energie [2]. Komplexní střevní mikroflóra omezuje multiplikaci patogenních bakterií [3] a princip kompetitivní exkluze patogenů je v produkci drůbeže znám desítky let [4]. Správné osídlení trávicího traktu je důležité zejména u nejmladších jedinců po vylíhnutí.

V případě komerční produkce drůbeže se kuřata líhnou bez jakéhokoli kontaktu s dospělými jedinci a kolonizace jejich trávicího traktu je zcela závislá na zdrojích z vnějšího prostředí, které nemusí vždy odpovídat optimálnímu složení. Ovlivnění skladby mikroflóry trávicího traktu kuřat s pozitivním dopadem na jejich zdravotní stav je tak v drůbežářském průmyslu jednoznačnou prioritou.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem tohoto funkčního vzorku bylo stanovit, zda je možné změnou složení krmných směsí ovlivnit skladbu střevní mikroflóry kuřat.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1 Skladba krmných směsí

Experimenty byly provedeny s využitím kohoutků masného hybrida JA757. Kuřatům v pokusných skupinách byly podávány krmné směsi se zvýšeným obsahem píce, a to jetele plazivého (*Trifolium repens*) a jílku vytrvalého (*Lolium perenne*), které byly zkrmovány kuřatům od 26. dne života po dobu osmi dnů.

Modifikované krmné směsi obsahovaly:

- 30 % sušeného jetele plazivého
- 60 % sušeného jetele plazivého
- 25 % sušeného jílku vytrvalého
- 55 % sušeného jílku vytrvalého

Kontrolní kuřata byla krmena komerční krmnou směsí. Všechny krmné směsi splňovaly požadavky na stejný a dostatečný obsah základních živin. Ve věku 34 dnů byla kuřata utracena a od každého zvířete byl odebrán obsah slepého střeva, který byl zamražen při -20°C. Zacházení se zvířaty bylo prováděno v souladu s českou legislativou podle zákona č. 246/1992 o Ochráně zvířat a welfare.

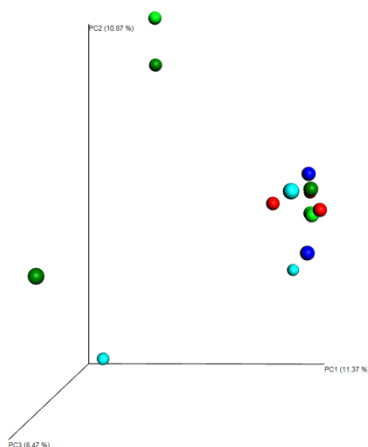
3.2 Sekvenční analýza genů pro 16S rRNA

Vzorky obsahu slepého střeva byly homogenizovány a následně z nich byla extrahována DNA pomocí QIAmp DNA Stool Mini kitu (Qiagen). DNA byla použita jako templát v PCR s forward primery se sekvencí 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' a reverse primery se sekvencí 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. Sekvence označené kurzívou sloužily jako adaptér pro ligaci, zatímco podtržené sekvence umožnily amplifikaci variabilní oblasti V3/V4 genů pro bakteriální 16S rRNA. Sekvence označené jako „MID“ o délce 5, 6, 7, 9 a 12 bp byly použity k rozlišení jednotlivých analyzovaných vzorků. PCR amplifikace a následné přečištění byly provedeny pomocí KAPA Taq HotStart PCR kitu (Kapa Biosystems). Následně bylo vždy 14 PCR produktů s rozdílnými „MID“ sekvencemi označeno různými oligonukleotidovými indexy pomocí Nextera XT Index kitu (Illumina) a koncentrace každé takto připravené směsi byla kvantifikována pomocí KAPA LibraryQuantification Complete Kit (Kapa Biosystems). Všechny vzorky byly naředěny na koncentraci 4 ng/μl, smíchány, a poté byla ke směsi přidána kontrolní DNA PhiX do výsledné koncentrace 20 %. Sekvenační reakce probíhaly v přístroji MiSEQ s využitím MiSeq Reagent kitu v3 (Illumina).

Data získaná po sekvenaci byla zpracována pomocí software Qiime [5]. Kvalitou vyhovující sekvence byly dále klasifikovány do jednotlivých OTU (Operation Taxonomic Units, taxonomických operačních jednotek) na základě 97% podobnosti. Jednotlivé OTUs byly identifikovány pomocí databáze RDP Seqmatch a dále zpracovány pomocí UniFrac analýzy [6]. U každého vzorku střevního obsahu bylo vypočteno procentuální zastoupení rodu, případně čeledě, v populaci, které bylo porovnáno pomocí Studentova t-testu mezi skupinami zvířat krmených modifikovaným krmivem a kontrolní skupinou.

3.3 Vliv přídatku pícnin na složení střevní mikroflóry

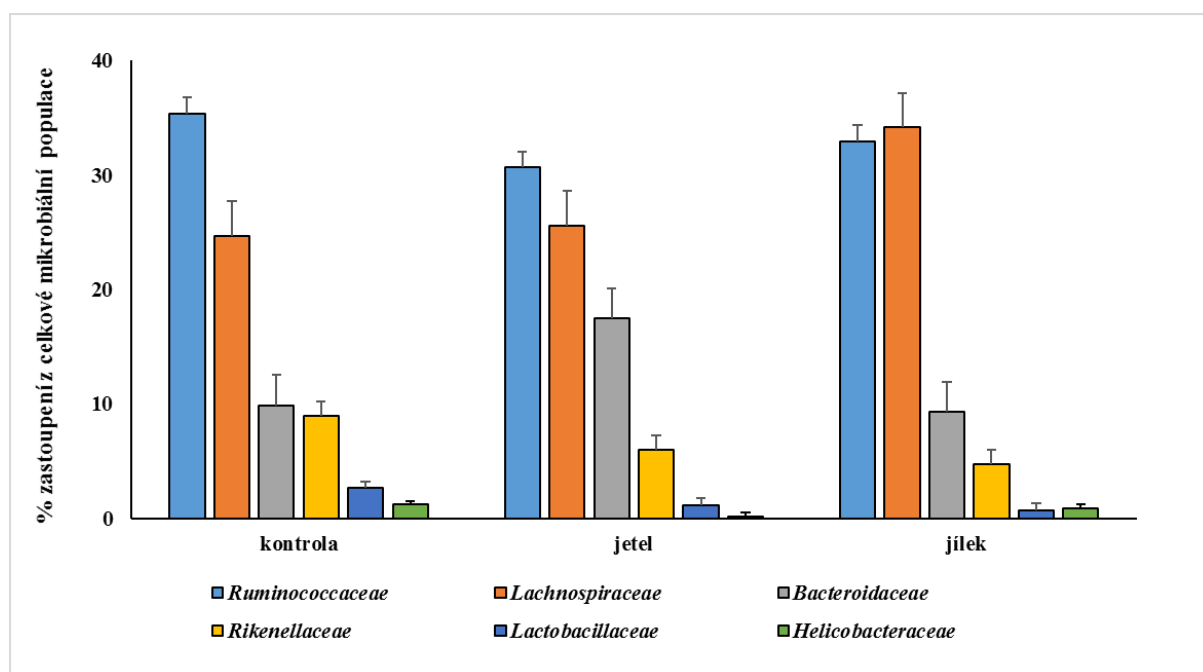
Vliv přídatku pícnin na složení střevní mikroflóry měl překvapivě relativně malý vliv na globální skladbu střevní mikroflóry, a to i přes neobvykle vysoké podíly pícnin v krmné směsi. PCoA analýza ukázala, že po přídatku jetele plazivého došlo k výrazné změně ve skladbě střevní mikroflóry pouze u tří kuřat z 6 testovaných. Po přídatku jílku vytrvalého dokonce došlo k výrazné změně ve skladbě střevní mikroflóry pouze u jednoho kuřete z 6 testovaných (Obr. 1).



Obr. 1. PCoA analýza skladby střevní mikroflóry kuřat v závislosti na složení krmné směsi. Červené body reprezentují kuřata z kontrolní skupiny bez přídatku pícnin. Odstíny zelené představují kuřata, kterým byla podávána krmná směs obohacená o jetel plazivý, přičemž světlejší barva představuje kuřata, kterým byla krmná směs obohacena o menší množství jetele. Tmavě zelená představuje kuřata, kterým byla podávána krmná směs s vyšším obsahem jetele. Odstíny modré reprezentují kuřata, kterým byla podávána krmná směs obohacená o jílku vytrvalý, přičemž světlejší barva představuje kuřata, kterým byla krmná směs obohacena o menší množství jílku. Tmavě zelená reprezentuje kuřata, kterým byla podávána krmná směs s vyšším obsahem jílku.

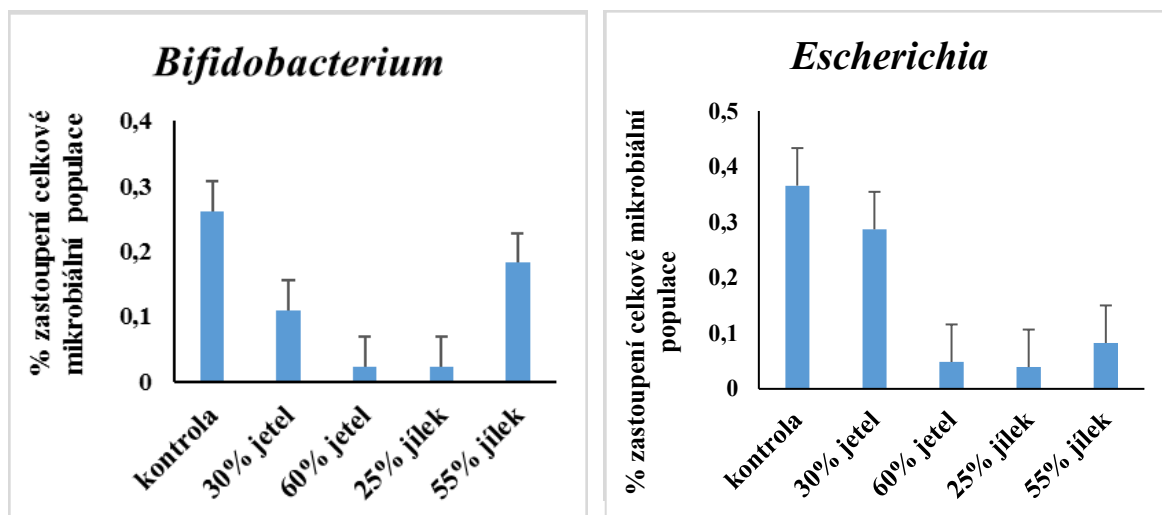
Přestože obohacení krmných směsí o pícevedlo ke globálním změnám ve skladbě střevní mikroflóry (Obr. 1), na úrovni čeledí, rodů nebo druhů, bylo možno identifikovat několik taxonů, u kterých došlo k signifikantním změnám. Mikrobiální složení obsahu slepého střeva 34denních kuřat ve všech skupinách tvořili především zástupci čeledi *Ruminococcaceae* (30 až 35 %) a *Lachnospiraceae* (24 až 34 %). Zástupci čeledi *Bacteroidaceae* tvořili třetí nejčtenější čeleď ve všech vzorcích a v menší míře byli detekováni i zástupci čeledi *Rikenellaceae*. Mezi 1 až 3 % z celkové populace se v mikroflóře slepého střeva 34denních kuřat vyskytovali i zástupci čeledi *Lactobacillaceae* a *Helicobacteriaceae* (Obr. 2). Všechny ostatní čeledě pak tvořily méně než jedno procento z celkového podílu detekovaných zástupců.

Přídavek jetele plazivého zvýšil v mikrobiální populaci slepého střeva zastoupení čeledi *Bacteroidaceae* oproti kontrole o více než 7 %. Přídavek jílku vytrvalého zvýšil v mikrobiální populaci slepého střeva zastoupení čeledi *Lachnospiraceae* oproti kontrolní skupině téměř o 10 % (Obr. 2). Procentuální zastoupení všech dalších nejčteněji zastoupených čeledí bylo po přídavku pícevedlo sníženo.



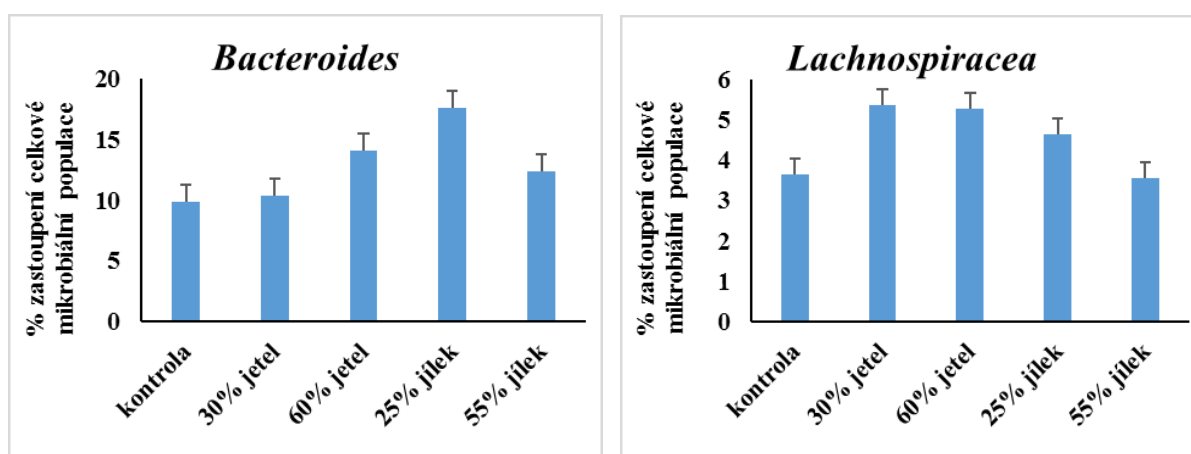
Obr. 2. Základní mikrobiální složení obsahu slepého střeva 34denních kuřat. V tomto obrázku byly zprůměrovány výsledky od všech kuřat, kterým byla zkrmována krmná směs obohacená o pícevedlo bez ohledu na procentuální zastoupení jetele resp. jílku v testovaných krmných směsích.

Vliv přítomnosti pícevedlo v krmivu na skladbu střevní mikroflóry kuřat byl sledován i na úrovni rodů. Rod *Alistipes*, který u kontrolní skupiny představoval téměř 9 % z celkové populace slepého střeva, vykazoval po přídavku 30 % jetele plazivého a 25 % jílku vytrvalého pokles (Obr. 3). Zvýšení podílu obou pícevedlo v krmných směsích vedl k dalšímu poklesu procentuálního zastoupení rodu *Alistipes* v mikrobiálním společenství střeva, a to na 3,4 % u skupiny kuřat krmené směsí s 60 % jetele plazivého a 5,5 % u skupiny kuřat krmené směsí s 55 % jílku vytrvalého. Obdobný trend byl zaznamenán i u dalších bakteriálních rodů, například *Escherichia*, *Vampirovibrio*, *Parasutterella*, *Akkermansia* nebo *Pseudoflavonifractor*. Přídavek pícevedlo do krmné směsi rovněž snížil procentuální zastoupení bakteriálních rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, přičemž větší pokles byl zaznamenán u skupin kuřat krmených modifikovanými směsmi s 60 % jetele plazivého a 25 % jílku vytrvalého.



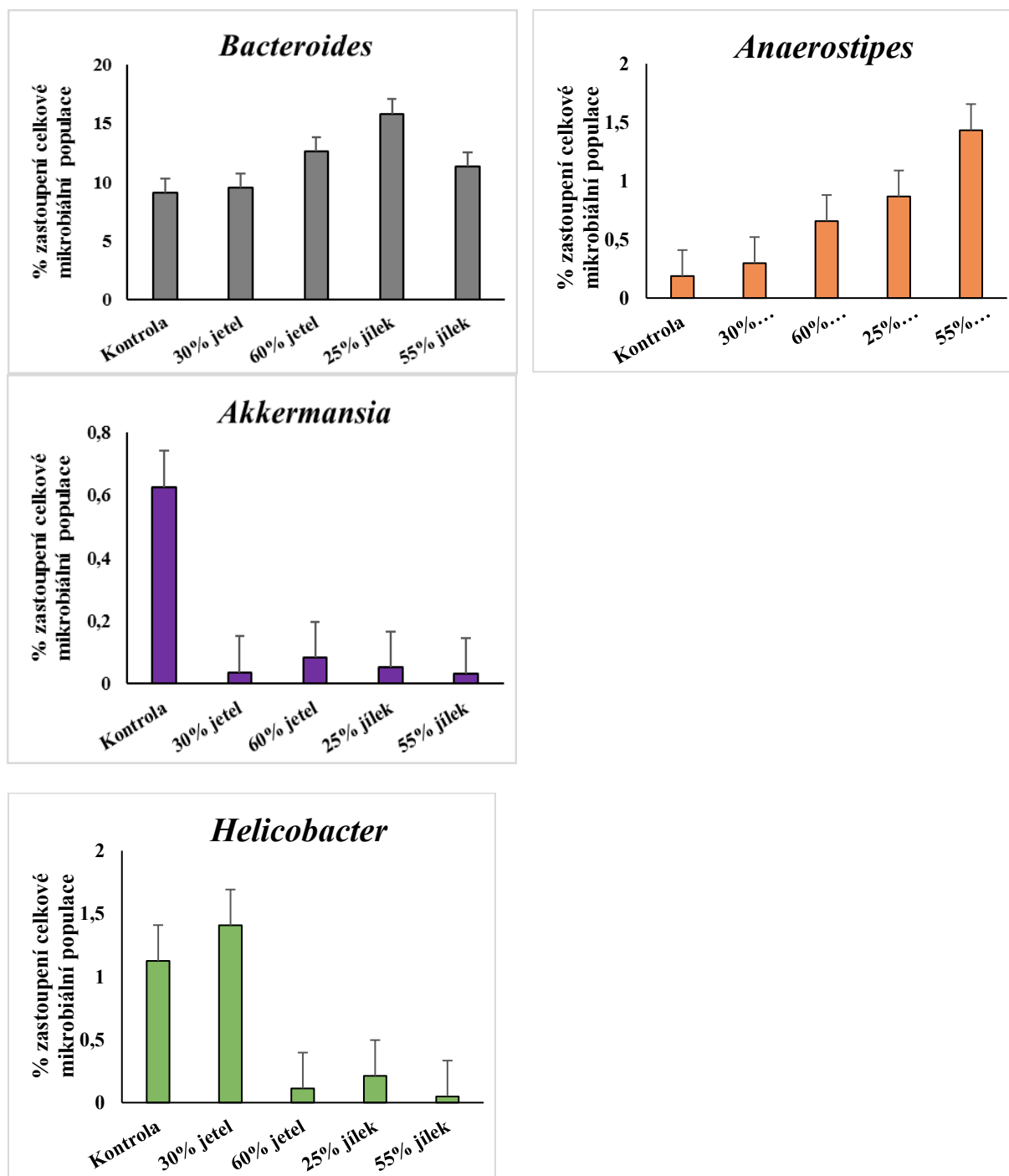
Obr. 3. Vliv složení krmné směsi na zastoupení zástupců vybraných rodů v mikroflóře slepého střeva kuřat. Zástupci rodů *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* nebo *Escherichia* reagovaly na obohacení krmné směsi o pícniny snížením svého zastoupení v mikroflóře slepého střeva kuřat.

U zástupců některých rodů došlo po obohacení krmných směsí o pícniny ke zvýšení jejich zastoupení v mikroflóře slepého střeva. Obohacení krmné směsi o 60% podíl jetele plazivého vedlo ke zvýšení zastoupení rodu *Bacteroides* 10 % v kontrolní skupině na 14 % (Obr. 4). Téměř dvojnásobný nárůst podílu rodu *Bacteroides* v bakteriální populaci slepého střeva byl zaznamenán u skupiny kuřat krmných směsí s 25 % jílku vytrvalého a krmná směs s 55 % obsahu jílku vytrvalého způsobila navýšení zastoupení bakterií rodu *Bacteroides* o další 3%. U zástupců čeledi *Lachnospiraceae* byl pozorován jejich nárůst ve střevě kuřat krmných směsí obohacenou o jetel plazivý. Nárůst zástupců čeledi *Lachnospiraceae* byl pozorován i po obohacení krmné směsi o 25 % jílku vytrvalého, přestože procentuální zastoupení této skupiny bakterií ve skupině kuřat krmných krmivem s 55 % sušeného jílku vytrvalého se výrazně nelišilo od kontrolní skupiny (Obr. 4).



Obr. 4. Vliv složení krmné směsi na zastoupení zástupců vybraných rodů v mikroflóře slepého střeva kuřat. Zástupci rodu *Bacteroides* a rodu v rámci čeledi *Lachnospiraceae* reagovali na obohacení krmné směsi o pícniny nárůstem svého zastoupení v mikroflóře slepého střeva kuřat.

Poslední srovnání jsme provedli na úrovni OTU (Operational Taxonomical Units, Pracovní taxonomické jednotky), což volně odpovídá bakteriálním druhům. Obohacení krmných směsí o píce vedlo ke zvýšenému zastoupení *Bacteroides* sp. nebo *Anaerostipes* sp., a naopak ke snížení výskytu *Akkermansia* sp. nebo *Helicobacter* sp. (Obr. 5).



Obr. 5. Vliv složení krmné směsi na zastoupení vybraných druhů (OTU) v mikroflóře slepého střeva kuřat. Zástupci druhů *Bacteroides* sp. nebo *Anaerostipes* sp. reagovali na obohacení krmné směsí o píce nárůstem svého zastoupení v mikroflóře slepého střeva kuřat. Zvýšený podíl píce v krmných směsích naopak vedl ke snížení výskytu *Akkermansia* sp. nebo *Helicobacter* sp.

4. Srovnání „novosti postupů“

Popsané změny ve skladbě mikrobiální populace střeva drůbeže potvrzují souvislosti s modifikacemi krmných směsí podávaných masnému typu kura domácího a složením

mikroflóry slepého střeva. Obohacení o píce vedlo ke snížení zástupců rodu *Escherichia*, mezi kterými se mohou nacházet patogenní klony. Zástupci rodu *Escherichia* jsou rovněž běžně rezistentní k antibiotikům a slouží jako rezervoár genů pro rezistence pro další gramnegativní patogeny jako je např. salmonela. Píce použité jako modelový krmný doplněk s vysokou pravděpodobností fungovaly zejména jako obohacení o nestrávitelné polysacharidy rostlinného původu. To může souviset s nárůstem zástupců rodu *Bacteroides*. Podobný nárůst zástupců rodu *Parabacteroides* jsme pozorovali v naší předchozí práci u prasnic ustájených na podestýlce tvořené slámou [7]. Zástupci rodu *Bacteroides* jsou typičtí pro mikroflóru dospělých slepic [8]. U kuřat po vylíhnutí se však nevyskytují, přestože trávicí trakt kuřete po vylíhnutí osídlit dokáží [9]. Obohacení krmné směsi o píce jako je jetel nebo jílek tak pozitivně ovlivňuje a urychluje rozvoj střevní mikroflóry u kuřat v komerční produkci.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Složením krmných směsí lze ovlivnit skladbu střevní mikroflóry kuřat ve velkokapacitních chovech. Přidávkou pícnin lze snížit podíl *Enterobacteriaceae* nebo *Helicobacter* a navýšit podíl zástupců mikroflóry, kteří jsou typičtí pro dospělé slepice. Tento funkční vzorek vede k prokázanému vztahu mezi konkrétním způsobem modifikace krmných směsí a potlačením či obohacením střevní mikroflóry přesně definovanými zástupci. Tyto výstupy najdou uplatnění ve formulaci krmiv pro masné typy kura domácího a obecně v kontrole a prevenci zdravotního stavu v komerčních chovech drůbeže.

6. Ekonomické aspekty

Optimální složení krmných směsí ovlivňuje zdravotní stav drůbeže. Z dalších experimentů víme, že zvýšený podíl zástupců rodu *Bacteroides* ve střevní mikroflóře částečně zvyšuje odolnost drůbeže před systémovou infekcí salmonelami. Zástupci rodu *Bacteroides* jsou rovněž klíčovými reprezentanty v komerčním přípravku Aviguard. Modifikace krmných směsí o píce tak může snížit výskyt *Helicobacter* sp., patogenních *E. coli* nebo salmonel, což povede ke zvýšení ekonomické rentability v chovech drůbeže. V konečném důsledku to povede ke zvýšení konkurenceschopnosti českých producentů drůbeže a bezpečnějším potravinám živočišného původu pro spotřebitele.

7. Seznam použité literatury

1. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-1920.
2. Fleming SE, Fitch MD, DeVries S, Liu ML, Kight C. Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon. *J Nutr* 1991;121:869-878.
3. Boyen F, Haesebrouck F, Vanparys A, Volf J, Mahu M, Van Immerseel F, Rychlik I, Dewulf J, Ducatelle R, Pasmans F. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet Microbiol* 2008;132:319-327.
4. Rantala M, Nurmi E. Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. *Br Poult Sci* 1973;14:627-630.
5. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335-6.
6. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005;71: 8228-35.

7. Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, Medvecký M, Polansky O, Gardan-Salmon D, Quesnel H, Rychlík I. Housing systems influence gut microbiota composition of sows but not of their piglets. PLoS One 2017;12:e0170051.
8. Vídenská P, Sedlář K, Lukáč M, Faldynova M, Gerzova L, Cejková D, Sisák F, Rychlík I. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. PLoS One 2014;9:e115142.
9. Varmuzová K, Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Sisák F, Havlicková H, Sebková A, Faldynova M, Rychlík I. Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella* Enteritidis infection. Front Microbiol 2016;7:957.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1610219 Využití střevní mikroflóry pro zvýšení přirozené rezistence masných typů kura domácího k infekcím bakteriálními patogeny a s podporou projektů AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01, RVO 0517.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz