



Mgr. Lanka
Vlasatíková,
Ph.D.,
Výzkumná
pracovnice

Kolonizace kuřat produkty kompetitivní exkluze vede k podstatným změnám v obsahu biologicky aktivních látek v trávenině slepého střeva

L. VLASATÍKOVÁ, M. ZEMAN, M. CRHÁNOVÁ, J. MATIAŠOVICOVÁ, D. KARASOVÁ, M. FALDYNOVÁ, H. PŘIKRYLOVÁ, A. ŠEBKOVÁ, I. RYCHLÍK
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

SOUHRN

Vlasatíková L., Zeman M., Crhánová M., Matiašovicová J., Karasová D., Faldynová M., Přikrylová H., Šebková A., Rychlík I.:

Kolonizace kuřat produkty kompetitivní exkluze vede k podstatným změnám v obsahu biologicky aktivních látek v trávenině slepého střeva. Veterinářství 2024;74(4):216-220.

Cílem této práce bylo porovnat složení metabolitů v trávenině slepého střeva kuřat s odlišným mikrobiálním osídlením. Kuřata byla osídlena komerčně dostupným produktem kompetitivní exkluze nebo vlastní směsí sestávající se z 23 anaerobních bakterií střevní mikroflóry. Mezi jednotlivými skupinami včetně neosídlených kontrolních kuřat byly zaznamenány rozsáhlé rozdíly. Celkem jsme zachytili 1706 různých metabolitů, ze kterých bylo 485 odlišně zastoupeno u kuřat osídlených komerčním produktem a 279 u kuřat osídlených vlastní směsí ve srovnání s kontrolními kuřaty. Sojasaponiny, betain, karnitin, glutamát, tyramin, fenylacetaldehyd nebo 3-metyladenin se ve zvýšené míře vyskytovaly v trávenině kontrolních kuřat. Naopak 4-oxododekandiová kyselina, nukleotidy, dipeptidy, aminokyseliny (s výjimkou glutamátu) a vitamíny byly obohaceny v trávenině kuřat osídlených produkty kompetitivní exkluze.

Klíčová slova: kuře, slepé střevo, metabolom, střevní mikroflóra, kompetitivní exkluze

SUMMARY

Vlasatíková L., Zeman M., Crhánová M., Matiašovicová J., Karasová D., Faldynová M., Přikrylová H., Šebková A., Rychlík I.: **Colonization of chickens with competitive exclusion products results in extensive differences in metabolite composition in caecal digesta.** Veterinářství 2024;74(4):216-220.

The aim of the study was to compare metabolites in the caecal digesta of differently colonized chickens. Chickens were treated with a commercial competitive exclusion product or with an experimental product consisting of 23 gut anaerobes. Extensive differences in metabolite composition in the digesta of chickens, in comparison to non-inoculate controls, were recorded. Out of 1706 detected compounds, 495 and 279 were differently abundant in the chicks treated with a commercial or experimental competitive exclusion product in comparison to the control group, respectively. Soyasaponins, betaine, carnitine, glutamate, tyramine, phenylacetaldehyde or 3-methyladenine were more abundant in the digesta of control chicks while 4-oxododecanedioic acid, nucleotides, dipeptides, amino acids (except for glutamate) and vitamins were enriched in the digesta of chickens colonized by competitive exclusion products.

Keywords: chicken, caecum, metabolome, microbiota, competitive exclusion

Úvod

Komplexní bakteriální směsi sestavené z bakterií trávicího traktu kuřat nebo komerční produkty obsahující nedefinovanou mikroflóru dospělých slepic účinně chrání kuřata před infekcí salmonelami¹. Ve skutečnosti ale není jasné, na jakém principu je tento fenomén založen, protože například imunitní odpověď kuřat na podání produktů kom-

petitivní exkluze je minimální. Jedno z možných vysvětlení je, že metabolity uvolněné bakteriemi střevní mikroflóry mohou ovlivnit chování patogenů. Bylo například prokázáno, že kyselina máselná (butyrát), což je běžný produkt anaerobní fermentace mnoha bakterií trávicího traktu, potlačuje expresi genů, které jsou spojené s virulencí *Salmonella*.²

1/1
VMEST

Podobně isoflavony pocházející ze sóji zlepšují produkční parametry drůbeže po infekci virem infekční bursitidy³. Metabolity produkované komplexní mikroflórou tedy mohou účinkovat přímo proti patogenním mikroorganismům.

Protože je možné experimentálně osídlit jednodenní kuřata libovolnou mikroflórou včetně té, která se vyskytuje u dospělých slepic⁴, využili jsme tuto skutečnost a porovnali jsme složení malých organických molekul, tedy metabolom, v trávenině slepého střeva odlišně osídlených kuřat. Smyslem bylo porovnat metabolity v trávenině kuřat osídlených vlastní definovanou směsí, kuřat osídlených komerčním produktem kompetitivní exkluze, a to ve srovnání s kontrolními kuřaty bez jakéhokoli experimentálního osídlení. Tato znalost by mohla být využita pro cílené obohacování tráveniny o žádoucí metabolity, a to podáváním vhodných probiotických preparátů nebo preparátů kompetitivní exkluze v kombinaci se složením krmných směsí.

Materiál a metody

Kuřata a bakteriální preparáty

Experiment byl proveden na 3 skupinách ISA Brown kuřat, kdy se každá skupina sestávala z 5 kuřat.

Kuřata ve dvou experimentálních skupinách byla první den života orálně inokulována produktem AVIGUARD nebo směsí 23 anaerobních bakterií pocházejících z trávicího traktu kuřat. Směs anaerobních bakterií se sestávala z *Bacteroides barnesiae*, *Bacteroides caecicola*, *Bacteroides caecigallinarum*, *Bacteroides coprophilus*, *Bacteroides gallinaceum*, *Bacteroides mediterraneensis*, *Bacteroides plebeius*, *Bacteroides salanitronis*, *Mediterranea massiliensis*, *Barnesiella viscericola*, *Bifidobacterium saeculare*, *Cloacibacillus porcorum*, *Desulfovibrio piger*, *Marseilla massiliensis*, *Megamonas funiformis*, *Megamonas hypermegale*, *Megasphaera hexanoica*, *Olsenella uli*, *Parasutterella secunda*, *Phascolarctobacterium faecium*, *Succinatimonas hippei*, *Sutterella faecalis* a *Veillonella magna*. Kuřata v kontrolní skupině zůstala bez jakéhokoli aktivního osídlení. Osmý den života byla kuřata utracena, a byl odebrán a zamražen obsah slepého střeva na stanovení metabolitů v trávenině.

Extrakce metabolitů z tráveniny slepého střeva

Sto miligramů tráveniny bylo smícháno s 300 µl roztoku metanol/voda v poměru 4 : 1 (v/v). Směs byla promíchávána 30 min. při 4 °C a po centrifugaci při 16 000x g po dobu 15 min. se supernatant přenesl do nové zkumavky. Po další inkubaci 15 min při -20 °C byly centrifugací odstraněny zbylé precipitované proteiny. Supernatant byl odpařen ve vakuu, sediment byl rozpuštěn v 50 µL směsi metanol/voda/acetonnitril (1 : 1 : 2) a 2 µl roztoku byly naneseny na chromatografickou kolonu. Parametry chromatografické separace a následné hmotnostní spektrometrie jsou detailně popsány v původní volně dostupné práci⁵.

Statistická analýza

Naměřená data byla porovnána analýzou rozptylů s Tuckeyho *post hoc* testem. Srovnání s $p < 0,05$ byla považována za signifikantně rozdílná.

Výsledky

Metabolity v trávenině slepého střeva kuřat

Celkem jsme zachytili 1706 různých metabolitů. Pouze u 98 z nich jsme však byli schopni přiřadit známé chemické názvosloví. Zbylé molekuly tak zůstaly identifikovány jen svými hmotnostně spektrometrickými parametry. Celkem 609 molekul (35,7 % ze všech 1706 detekovaných molekul) bylo signifikantně odlišně zastoupeno v trávenině experimentálních a kontrolních kuřat. V trávenině kuřat ošetřených produktem AVIGUARD bylo 204 molekul ve vyšším a 291 v nižším zastoupení než u kontrolních kuřat. V trávenině kuřat osídlených definovanou anaerobní směsí jsme pak detekovali 157 metabolitů ve vyšším zastoupení a 122 v nižším zastoupení než u kontrol.

Odlišně zastoupené molekuly se známým chemickým názvoslovím

Pouze 58 odlišně zastoupeným molekulám bylo možné přiřadit známé chemické názvy. Mezi takové molekuly patřily zejména nukleotidy, aminokyseliny, lipidy, vitamíny a některé molekuly rostlinného původu.

Jediný derivát nukleotidů, který se vyskytoval signifikantně více v trávenině kontrolních kuřat, byl 3-methyladenin. Ostatní deriváty nukleotidů byly zastoupeny více u jedné nebo obou skupin experimentálních kuřat. Guanin a xanthin byly obohaceny v trávenině obou experimentálních skupin, hypoxanthin, adenosin, cytidin a cytosin u kuřat ošetřených produktem AVIGUARD, a adenine a deoxyadenosin byly obohaceny v trávenině kuřat osídlených definovanou směsí anaerobů (obr. 1).

Glutamát, acetyl-lysin, tyramin a fenylacetaldehyd dominovaly v trávenině kontrolních kuřat a byly signifikantně méně zastoupeny v obsahu slepých střev obou experimentálních skupin. Ostatní aminokyseliny a jejich degradační produkty jako např. prolin, isoleucin, tyrosin, kynurenát a metylimidazoloctová kyselina byly obohaceny v trávenině obou skupin experimentálních kuřat. Histidin, prolinamid a citrulin dominovaly v trávenině kuřat ošetřených produktem AVIGUARD a tryptofan, metionin a metionin sulfoxid byly ve zvýšené míře zastoupeny u kuřat osídlených definovanou směsí anaerobů (obr. 1).

Tři různé fosfolipidy, sfingosin a 4-oxododecanediová kyselina představovaly metabolity lipidové povahy, které se ve zvýšené míře vyskytovaly v trávenině obou experimentálně osídlených skupin (obr. 1).

Odlišné osídlení kuřat ovlivnilo i množství vitamínů a kofaktorů v trávenině. Pyridoxát a nikotinamid byly signifikantně obohaceny v trávenině kuřat osídlených definovanou směsí anaerobů. Na druhou stranu, panto-

CTRL	AVI	ANA	
	*		SINAPOYLCHOLINE ETHER*
	*		TERPEN LACTONE*
	*		DEOXYCARNITINE
	*		3-METHYLADENINE
	*		L-CARNITINE
	*	*	CAFFELOYL PUTRESCIN
	*	*	SOYASAPONIN I
	*	*	SOYASAPONIN BA
	*	*	BETAINE
	*	*	PHENYLACETALDEHYDE
	*	*	GLUTAMATE
	*	*	TYRAMINE
	*	*	N-ALPHA-ACETYLLYSINE
	*	*	6"-O-MALONYLGENISTIN
	*	*	METHYLADENOSIN
	*	*	INOSINE
	*	*	PANTOTHENATE
	*	*	HYPOXANTHINE
	*	*	CITRULLINE
	*	*	PROLINEAMIDE
	*	*	L-HISTIDINE
	*	*	XANTHINE
	*	*	2-AMINOPHENOL
	*	*	ADENOSINE
	*	*	5-AMINOPENTANOATE
	*	*	LEU-PHE
	*	*	INDOLEACETALDEHYDE
	*	*	TYROSINE
	*	*	CYTIDINE

CTRL	AVI	ANA	
	*	*	GUANINE
	*	*	PHOSPHOCHOLINE_1*
	*	*	PHOSPHOCHOLINE_2*
	*	*	CYTOSINE
	*	*	L-ISOLEUCINE
	*	*	METHIONINE
	*	*	PROLINE
	*	*	4-OXODODECANEDIOIC ACID
	*	*	KYNURENATE
	*	*	L-METHIONINE SULFOXIDE
	*	*	ADENINE
	*	*	PHOSPHOCHOLINE_3*
	*	*	SOLANINE
	*	*	5'-DEOXYADENOSINE
	*	*	SPHINGOSINE (D18:1)
	*	*	METHYLIMIDAZOLEACETIC ACID
	*	*	TRYPTOPHAN
	*	*	4-PYRIDOXATE
	*	*	LEU-PRO
	*	*	TRANS-3-INDOLEACRYLIC ACID
	*	*	PROPIONYL CARNITINE
	*	*	FERULOYL AGMATINE
	*	*	FERULOYL PUTRESCINE
	*	*	NICOTINAMIDE
	*	*	GLYCITEIN
	*	*	GENISTEIN
	*	*	DAIDZEIN
	*	*	DIHYDROBIOPTERIN
	*	*	O-ACETYLCARNITINE

Obr. 1 – Zastoupení metabolitů se známým chemickým názvoslovím v trávenině slepého střeva kuřat. CTRL – kontrolní kuřata, AVI – kuřata osídlená bakteriemi z produktu AVIGUARD; ANA kuřata osídlená směsí definovaných střevních anaerobních bakterií. Modrá barva znamená nízké zastoupení dané molekuly v trávenině. Červenohnědá barva – molekuly s vysokým zastoupením v trávenině slepého střeva kuřat. Bílá barva – molekuly a metabolity s průměrným zastoupením v trávenině slepého střeva. * – signifikantně odlišné zastoupení od množství v trávenině kontrolních kuřat. # – metabolity se zkráceným názvem v obrázku. Plný název je SINAPOYLCHOLINE ETHER: Guaiasyglycerol- β -Sinapoylcholin Ether, TERPEN LACTONE: (4r)-3-Methylidene-4-[(E)-3-Methyl-4-(4-Methyl-5-Oxoxolan-2-Yl)But-2-Enyl]Oxolan-2-One, PHOSPHOCHOLINE_1: 1-(9z-Octadecenoyl)-Sn-Glycero-3-Phosphocholine, PHOSPHOCHOLINE_2: 1-Stearoyl-2-Hydroxy-Sn-Glycero-3-Phosphocholine, PHOSPHOCHOLINE_3: 1-Hexadecanoyl-2-Octadecadienoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine.

tenát by signifikantně nejméně zastoupen v trávenině kuřat osídlených definovanou směsí anaerobů a dihydrobiopterin byl nejméně zastoupen v trávenině kuřat osídlených produktem AVIGUARD (obr. 1).

Kolonizace kuřat striktně anaerobními bakteriemi ovlivnila i zastoupení biologicky aktivních látek rostlinného původu. Betain, kafeoyl putrescin, karnitin, deoxykarnitin, sojasaponin Ba a sojasaponin I se ve zvýšené míře vyskytovaly v trávenině kontrolních kuřat. Feruloyl agmatin, feruloyl putrescin, propionyl karnitin, genistein, glycitein, daidzein a solanin se v nejvyšším množství vyskytovaly v trávenině kuřat osídlených definovanou směsí anaerobů (obr. 1).

Diskuse

Osídlení kuřat bakteriemi, které jsou charakteristické pro dospělé slepice, vedlo k rozsáhlým změnám v zastoupení malých molekul a metabolitů v trávenině slepého střeva. Více než 600 různých molekul vykazovalo signifikantně odlišné zastoupení v trávenině kontrolních kuřat

a některé ze dvou experimentálních skupin. Již jen tento poznatek ukazuje, že osídlením trávicího traktu definovanými bakteriemi je možné ovlivnit dostupnost biologicky aktivních látek pro kuře. V budoucnu pak bude zajímavé tento poznatek dále rozvíjet např. společně s úpravou složení krmných směsí. Samotná příčina zvýšené nebo snížené přítomnosti konkrétních molekul však není úplně jasná. Ve většině případů se zřejmě jedná o důsledek dodatečné degradační aktivity nově vnesených bakterií. Po degradaci polysacharidů buněčných stěn rostlinných buněk v krmných směsích dojde k uvolnění nových molekul z cytoplazmy těchto buněk do tráveniny. Jako možný příklad mohou do této skupiny spadat aminokyseliny, nukleotidy a jejich deriváty, ale i betain, sojasaponiny nebo isoflavony genistein, glycitein, daidzein původem ze sóji. Nově introdukované bakterie však mohou i degradovat určité molekuly a pak lze zaznamenat jejich pokles u experimentálně osídlených, což může být případ betainu, který se nejvíce vyskytoval v trávenině kontrolních kuřat. Nelze však vyloučit i možnost, že samotné kuře uvolňuje do lumen

trávicího traktu některé své molekuly a metabolity v závislosti na složení střevní mikroflóry, což by mohl být případ karnitinu. Se současnou úrovní znalostí ale není jednoznačná ani interpretace důsledku zvýšeného zastoupení některých biologicky aktivních látek v trávenině. Tento stav lze sice považovat za pozitivní, ale současně indikuje, že došlo k překročení resorbčních schopností kuřat. Lokálně obohacené mohou tyto molekuly v trávenině slepého střeva stále vykazovat ochranné aktivity, ale jejich dopad na metabolismus v dalších orgánech a tkáních nemusí pro dosažení a překročení resorbčních schopností trávicího traktu podobně významný.

I přes některá omezení, např. že 90 % metabolitů jsme nedokázali identifikovat jinak než celkovou molekulovou hmotností, mají některá naše pozorování zajímavé souvislosti. Fenylacetaldehyd se ve zvýšené míře vyskytoval v trávenině kontrolních kuřat. Fenylacetaldehyd se však vyskytuje i v květech rostlin, kde funguje jako hmyzí chemoatraktant⁶. Mikroflóra, která vede ke zvýšenému zastoupení fenylacetaldehydu v trusu, tedy může zvyšovat i atraktivnost trusu pro hmyz. *Salmonella* účinně infikuje zejména kuřata v prvních dnech života, tedy stejnou věkovou skupinu, jakou představovala kontrolní skupina v tomto experimentu⁷. Zvýšená hladina fenylacetaldehydu v trusu mladých kuřat, pokud jsou současně infikována salmonelami, tedy může zvyšovat pravděpodobnost přenosu salmonel na nového hostitele prostřednictvím hmyzu. Na druhou stranu, 4-oxododekandiová kyselina se ve zvýšené míře vyskytovala v trávenině experimentálních kuřat. Kyselina 4-oxododekandiová kyselina má toxické účinky na rozvoj larev *Spodoptera exigua*⁸. Jestliže trus řádně kolonizovaných kuřat vykazuje toxické účinky na larvy koprofágního hmyzu, tato kolonizace může naopak snižovat pravděpodobnost přenosu fekální mikroflóry hmyzem na větší vzdálenosti.

Mezi odbornou komunitou není pochyb, že osídlení kuřat komplexní mikroflórou z dospělých slepic vede k jejich okamžité ochraně před kolonizací salmonelami. Tento efekt dokážeme docílit i podání definovaných směsí anaerobních bakterií. Proč se tak děje, ale není úplně jasné. Experimentálně jsme dříve prokázali reakci kuřete na osídlení vyjádřenou zvýšenou expresí genů imunitního systému, ale toto navýšení exprese bylo numericky nízké a nekorespondovalo se zvýšením odolnosti před kolonizací salmonelami až o šest řádů. Současná studie poukazuje na podstatné rozdíly

v zastoupení biologicky aktivních látek v trávenině odlišně osídlených kuřat poprvé ukazuje na rozdíly, které jsou svým rozsahem podobné rozdílům v citlivosti vůči kolonizaci salmonelami. Zda se jedná o příčinou souvislost, to bude muset být předmětem dalších studií. Ale samotná možnost ovlivňovat zastoupení molekul, jako je glutamát, tyramin, kynurenát, isoflavonoidy, fenolaminy, nukleotidy, aminokyseliny nebo vitamíny ukazuje, na význam střevní mikroflóry pro kuřata, umožňuje i opatrnou extrapolaci k jiným živočišným druhům včetně člověka, a v produkci drůbeže otevírá nové možnosti v kombinaci podávání probiotik a na míru upravených krmných směsí.

Práce v laboratoři autorů je podporována projektem TN02000017 Technologické agentury ČR a projektem RO0523 Ministerstva zemědělství ČR.

Literatura:

1. 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;14:627-30.
2. GANTOIS, I., DUCATTELL, R., PASMANS, F., HAESBROUCK, F., HAUTEFORT, I., THOMPSON, A., a kol. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:946-9.
3. AZZAM, M. M., JIANG, S. Q., CHEN, J. L., LIN, X. J., GOU, Z. Y., FAN, Q. L., a kol. Effect of Soybean isoflavones on growth performance, immune function, and viral protein 5 mRNA expression in broiler chickens challenged with Infectious Bursal Disease Virus. *Animals (Basel)* 2019;9:247.
4. VARMUZOVA, K., KUBASOVA, T., DAVIDOVA-GERZOVA, L., SISA, F., HAVLICKOVA, H., SEBKOVA, A., a kol. Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella* Enteritidis Infection. *Front Microbiol* 2016;7:957.
5. VLASATIKOVA, L., ZEMAN, M., CRHANOVA, M., MATIASOVICOVA, J., KARASOVA, D., FALDYNOVA, M., a kol. Colonization of chickens with competitive exclusion products results in extensive differences in metabolite composition in cecal digesta. *Poult Sci* 2024;103:103217.
6. BATALLAS, R.E., EVENDEN, M. L. Fermented or floral? Developing a generalized food bait lure to monitor Cutworm and Armyworm moths (*Lepidoptera: Noctuidae*) in field crops. *Insects* 2023;14:106.
7. BEAL, R. K., WIGLEY, P., POWERS, C., HULME, S. D., BARROW, P. A., SMITH, A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;100:151-64.
8. RIVERO, J., LIDOY, J., LLOPIS-GIMENEZ, A., HERRERO, S., FLORS, V., POZO, M. J. Mycorrhizal symbiosis primes the accumulation of antiherbivore compounds and enhances herbivore mortality in tomato. *J Exp Bot* 2021;72:5038-50.

Adresa autora:

Mgr. Lenka Vlasatíková, Ph.D.,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Hudcova 70,
621 00, Brno