

Tuotantoeläinten normaalin suolistomikrobiston kartoitus luo suolistoterveytutkimukselle perustaa

Jussi Vaahtovuo¹⁾, Mika Korkeamäki¹⁾, Eveliina Munukka¹⁾, Pirkko Hämeenoja²⁾, Juhani Vuoremaa²⁾ ja Asko Haarasilta²⁾

¹⁾ *CyFlo, Itäinen Pitkäkatu 4 B, 20520 Turku, etunimi.sukunimi@cyflo.fi*

²⁾ *Suomen Rehu, Upseerinkatu 1, PL 401, 02601 Espoo, etunimi.sukunimi@suomenrehu.com*

Tiivistelmä

Ruoansulatuskanavan mikrobiston koostumus vaikuttaa keskeisellä tavalla eläinten terveyteen ja kasvatustuloksiin. Esimerkiksi ripulitilanteissa suoliston bakteerit vaikuttavat eläinten hyvinvointiin välittömästi, mutta lisäksi suolistomikrobeilla on pitkäkestoisia eläimen immuunivastetta ja ravitsemustilaa muuntavia vaikutuksia. Suolistomikrobiston poikkeuksellisen monimutkaisuuden vuoksi mikrobisto ja sen koostumus ovat kuitenkin vielä nykyäänkin heikosti tunnettuja. Ruoansulatuskanavan bakteeristo muodostuu poikkeuksellisen monista lajeista ja bakteeritiheys on ainutlaatuisen korkea. Perinteiset patogeenisten bakteerien tunnistamiseen kehitetyt tutkimusmenetelmät eivät ole mahdollistaneet mikrobiston kokonaisvaltaista kartoitusta. Viime vuosina kehitettyjen modernien tutkimustekniikoiden ansiosta mikrobiston tutkimusmahdollisuudet ovat kuitenkin parantuneet.

Suolistomikrobiston koostumuksen kartoittaminen ja mikrobiston muutosten tutkiminen eri tilanteissa luo perustaa tulevaisuuden suolistomikrobistotutkimukselle. Nyt esiteltävässä tutkimuksessa suolistonäytteiden bakteerikoostumusta kartoitettiin koneellista sytometriaan, DNA-värjäykseen ja oligonukleotidihybridisaatioon perustuvaa menetelmää käyttäen. Tutkimusnäytteitä kerättiin porsaista, sioista, kalkkunoista, broilereista ja kanoista. Tutkimuseläimet olivat useista eri kasvatuseristä ja ne kuvastavat kunkin eläinlajin suolistomikrobistoa yleisellä tasolla. Näytteistä määritettiin kokonaisbakteerimäärät sekä keskeisimpien bakteerisukujen edustajien määrät.

Erot saman eläinlajin eri yksilöiden välillä olivat huomattavasti pienempiä kuin erot eri eläinlajien välillä. Kahdesta eri porsastutkimuksesta kerättyjen ulostenäytteiden kokonaisbakteerimäärät ja eri bakteerisukujen osuudet olivat pitkälti samanlaiset. Tutkittujen cecum- ja ulostenäytteiden bakteeritiheys oli luokkaa 10^{11} bakteeria grammassa ja eläinlajista riippuen *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* -ryhmän, *Faecalibacterium prausnitzii* -ryhmän ja *Bifidobacterium*-suvun bakteerit olivat nyt tutkituista bakteereista yleisimpiä.

Saadut tulokset vahvistavat käsitystä siitä, että kullakin eläinlajilla on sille ominainen mikrobisto, joka koostuu ko. eläinlajille tyypillisistä mikrobeista. Ruoansulatuskanavan mikrobit muodostavat monimutkaisen ekosysteemin, joka kuitenkin on stabiilien elinolosuhteiden vallitessa sisäisessä tasapainotilassa. Saatuja tuloksia voidaan käyttää vertailumateriaalina tulevissa suolistomikrobistotutkimuksissa ja tuloksista on hyötyä kehitettäessä suolistoterveyttä tukevaa ruokintaa.

Johdanto

Ruoansulatuskanavan mikrobit muodostavat monimutkaisen ekosysteemin, jolla on keskeisiä vaikutuksia eläinten hyvinvointiin ja tuotantotuloksiin. Suolistobakteeriston koostumus vaikuttaa esimerkiksi ravintoaineiden metaboliaan ja imeytymiseen sekä suolen sisällön koostumukseen. Suoliston mikrobit ovat tiiviissä kanssakäymisessä eläimen immuunisolujen kanssa ja suolistomikrobiston bakteerit muokkaavat immuunivasteita ja hormonitoimintaa (Hooper ja Gordon 2001). Tietämys suolistomikrobiston koostumuksesta eri eläinlajeilla sekä ruokinnan ja mikrobiston välisistä yhteyksistä on kuitenkin vähäistä. Yksi suurimmista suolistomikrobistotutkimusta rajoittavista tekijöistä on ollut tutkimusmenetelmien puutteellisuus (Zoetendal ym. 2004). Monimutkaisten suolistomikrobistonäytteiden tutkiminen on erittäin haasteellista, sillä suolistomikrobisto koostuu sadoista bakteerilajeista ja sen bakteeritiheys on ainutlaatuisen korkea.

Tuotantoeläinten ruokinnan kehittyessä suolistomikrobiston ja hyvän suolistoterveyden merkitys onnistuneen ruokinnan osa-alueena on kasvanut (Dibner & Richards 2005). Suomen Rehun suolistobakteeritutkimuksen tavoitteena on mm. kehittää keinoja suolistomikrobiston koostumuksen tutkimiseksi ja suolistomikrobiston muutosten hallitsemiseksi. Bakteerien tunnistus ja suolistoterveyden tukeminen integroidaan onnistuneen ruokinnan keskeiseksi osa-alueeksi.

Aineisto ja menetelmät

Tutkimusnäytteitä kerättiin vuosien 2003 – 2005 aikana Wageningenin yliopistossa Hollannissa, Foulumin tutkimuskeskuksessa Tanskassa, Munkkilan koetilalla Paimiossa ja MTT:n Jokioisten tutkimusyksikössä. Näytetyypit olivat: porsaan uloste ($n = 180$), sian uloste ($n = 242$), kalkkunan umpisuolen sisältö ($n = 133$), broilerin umpisuolen sisältö ($n = 96$) ja kanan umpisuolen sisältö ($n = 15$). Tutkimuseläimet olivat useista eri kasvatuseristä ja ne olivat osallistuneet seurantatutkimuksiin, joissa oli tutkittu erilaisten rehujen vaikutuksia mm. kasvutuloksiin. Näytteet edustavat täten luonnollisesti vaihtelevaa ja merkittävää otosta ko. eläinlajien suolistomikrobistonäytteistä.

Suolistonäytteiden bakteerilaskenta toteutettiin sytometriaan perustuvalla menetelmällä (Vaahtovuori ym. 2005). Menetelmä mahdollistaa kokonaisten bakteerisolujen laskennan ainutlaatuisen nopeasti ja tarkasti. Ennen sytometria-analyysia bakteerisolut eristettiin näytteestä ja kiinnitettiin. Käsittelyn seurauksena saadaan hyvin säilyvä kiinnitettyjä bakteereita sisältävä 50 % etanoliliuos. Sytometrisessä bakteerilaskennassa käytettiin bakteerien nukleiinihappoihin sitoutuvaa fluoresoivaa väriainetta (DNA-värjäys) ja bakteerisuku- tai bakteerilajispesifisen tunnistuksen mahdollistavia fluoresoivia oligonukleotidikoettimia (FISH; fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio). Kerätyistä suolistomikrobistonäytteistä määritettiin kokonaisbakteerimäärät sekä eläinlajeista riippuen mm. *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* -ryhmän bakteerien, *Bifidobacterium*-suvun bakteerien, ns. enteerisen ryhmän bakteerien (mm. *Escherichia coli*), *Faecalibacterium prausnitzii* -ryhmän bakteerien ja *Clostridium leptum* -ryhmän bakteerien määriä kirjallisuudessa aiemmin dokumentoituja koettimia käyttäen.

Tulokset

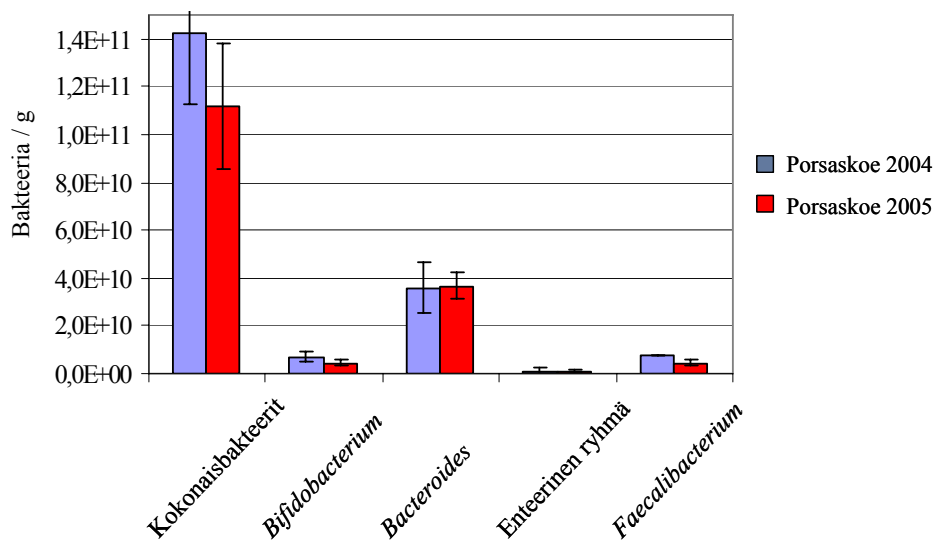
Tuloksia eri eläinlajien suolistobakteeriston analyyseista on esitetty Taulukossa 1. Erot saman eläinlajin eri yksilöiden välillä olivat huomattavasti pienempiä kuin erot eri eläinlajien välillä. Kalkkunan, broilerin ja kanan umpisuolinäytteissä oli korkein kokonaisbakteeritiheys, luokkaa $2,5 - 3,6 \times 10^{11}$ grammassa. Porsaiden ja sikojen ulostenäytteiden kokonaisbakteerimäärä oli $1,3 \times 10^{11}$ bakteeria grammassa. Porsailla ja sioilla yli 20 % ulosteen bakteereista kuului *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* -ryhmään. Siipikarjalla *Faecalibacterium prausnitzii* -ryhmän bakteerit ja *Bifidobacterium*-suvun bakteerit olivat nyt tutkituista bakteereista yleisimpiä ja yhdessä ne edustivat noin kolmasosaa kaikista bakteereista. Erilaiset *Clostridium*-suvun bakteerit muodostavat fylogeneettisesti heterogeenisen ryhmän. *Clostridium leptum* -ryhmän bakteereita löytyi porsailta, sioilta ja broilereilta 1 – 2 % verran. Enteerisen ryhmän bakteerien osuus oli odotetusti pieni kaikilla tutkituilla eläinlajeilla. Kuvassa 1 esitetään kahden Munkkilan koetilalla suoritetun porsaskokeen tuloksia. Kummassakin tutkimuksessa porsaiden ulostenäytteiden kokonaisbakteerimäärät ja eri bakteerisukujen osuudet suoliston kokonaisbakteerimäärästä olivat samaa suuruusluokkaa.

Taulukko 1.

Eläinlaji	Porsas	Sika	Kalkkuna	Broileri	Kana
Bakteeri					
Kokonaisbakteerit	$1,3 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^{11}$
<i>Bacteroides-Porphyrromonas-Prevotella</i> -ryhmä	$3,7 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^9$	ND
<i>Bifidobacterium</i> -ryhmä	$5,4 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	$3,7 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$
Enteerinen ryhmä	$8,5 \times 10^8$	$9,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$5,1 \times 10^9$
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> -ryhmä	$5,4 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{10}$	ND
<i>Clostridium leptum</i> -ryhmä	$4,5 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	ND	$3,0 \times 10^9$	ND

Bakteerien kappalemäärät grammassa kuiva-ainetta. ND = ei määritetty.

Bakteerimäärät kahdessa eri porsaskokeessa



Kuva 1. Porsaiden ulostenäytteiden kokonaisbakteerimäärä sekä *Bifidobacterium*-suvun bakteerien, *Bacteroides-Porphyrromonas-Prevotella* -ryhmän bakteerien, enterisen ryhmän bakteerien ja *Faecalibacterium prausnitzii* -ryhmän bakteerien määrät kahdessa eri ruokintakokeessa. Kokonaisbakteerien ja eri ryhmien bakteerien määrät ovat samaa suuruusluokkaa kummassakin tutkimuksessa.

Johtopäätökset

Saadut tulokset vahvistavat käsitystä suolistomikrobistosta erittäin monimutkaisena ekosysteeminä, joka kuitenkin on stabiilien elinolosuhteiden vallitessa sisäisessä tasapainotilassa. Kunkin eläinlajin ruoansulatuskanavassa on normaalimikrobisto, joka koostuu kyseiselle eläinlajille luonteenomaisista bakteerilajeista ja niiden määräsuhteista. Porsaiden ja lihasikojen suolistobakteeristot olivat nyt tutkittujen bakteerien osalta samankaltaisia. Havainto on sopusoinnussa aikaisempien kirjallisuustietojen kanssa, joiden mukaan suolistomikrobisto on stabiili, mutta saattaa muuttua eläimen kasvaessa. Nyt tutkitut näytteet olivat peräisin usean eri kasvatuserän eläimistä, jotka olivat saaneet erilaisia teollisesti tuotettuja tai maataloilla sekoitettuja rehuja. Täten analyysitulokset kuvastavat kunkin eläinlajin suolistomikrobiston koostumusta yleisellä tasolla.

Saatuja tuloksia voidaan käyttää vertailumateriaalina tulevissa suolistomikrobistotutkimuksissa. Tuotantoeläinten ruokinta kehittyy jatkuvasti ja tulevaisuudessa suoliston eri mikrobipopulaatioiden suhteellisten osuuksien ja absoluuttisten määrien optimointi tulee olemaan keskeinen osa eläinten hyvinvointia ja suolistoterveyttä (Gaskins ym. 2002). Jatkotutkimusten tavoitteena on hankkia lisää tietoa suolistobakteeriston muutoksista erilaisissa tilanteissa. Lisääntyvän tietämyksen myötä suolistomikrobiston koostumusta ja sen muutoksia tullaan käyttämään yhtenä eläinterveyden ja ruokinnan onnistumisen mittarina. Tulevaisuudessa suolistomikrobiston koostumuksen ja sen muutosten ymmärrystä hyödynnetään entistä laajemmassa mitassa mm. eläinten vastustuskyvyn parantamisessa ja sairauksien ehkäisyssä.

Kirjallisuus

Dibner, J.J. & Richards, J.D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84: 634-643.

Gaskins, H.R., Collier, C.T. & Anderson, D.B. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.* 13: 29-42.

Hooper, L.V. & Gordon, J.I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.

Vahtovuo, J., Korkeamäki, M., Munukka, M., Viljanen, M.K. & Toivanen, P. 2005. Quantification of bacteria in human feces using 16S rRNA hybridization, DNA-staining and flow cytometry. *J. Microbiol. Methods.* 63:276-286.

Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I. & Gaskins, H.R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J. Nutr.* 134: 465-472.