ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.62
https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-280-288

Поступила в редакцию 29.07.2024
Received 29.07.2024

Н. В. Сверчкова[1], И. А. Проскурнина[1], В. С. Летвинова[2], Н. Е. Рябая[3], А. И. Саханчук[4], Э. И. Коломиец[1]

[1]Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Республика Беларусь

[2]Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва, Российская Федерация
[3]Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[4]Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству, Жодино, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА МИКРОБИОМ РУБЦА ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

Аннотация. Подобраны методы выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров, позволяющие получить препараты нуклеиновых кислот высокой чистоты без ингибиторов ПЦР. Определены доминирующие таксоны микробиома рубца молочных коров, подобраны праймеры и температурно-временные параметры для их выявления методом ПЦР. Показана целесообразность использования кормовых добавок «Споробакт-К» на основе бактерий рода *Bacillus* и «Румибакт» на основе пропионовокислых бактерий для контроля условно-патогенной микробиоты, улучшения рубцового пищеварения и снижения риска развития ацидоза у лактирующих коров.

Ключевые слова: микробиом рубца, ацидоз, пропионовокислые бактерии, спорообразующие бактерии, пробиотическая кормовая добавка, антагонистическая активность, ферментативная активность

Для цитирования: Влияние пробиотиков на микробиом рубца лактирующих коров / Н. В. Сверчкова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 280–288. https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-280-288

Natalia V. Sverchkova[1], Irina A. Proskurnina[1], Veronika S. Letvinova[2], Natalia E. Ryabaya[3], Anna I. Sachanchuk[4], Emiliya I. Kolomiets[1]

[1]State Scientific and Production Association "Chemical Synthesis and Biotechnology", Minsk, Republic of Belarus
[2]N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[3]Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[4]Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Livestock, Zhodino, Republic of Belarus

EFFECT OF PROBIOTICS ON THE RUMEN MICROBIOME OF LACTATING COWS

Abstract. Methods for isolating metagenomic DNA from the rumen fluid of dairy cows have been selected and have made it possible to obtain high-purity nucleic acid preparations without PCR inhibitors. The probiotic potential of feed additives "Sporobact-K" and "Rumibact" based on spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* and the propionic acid bacteria of the genus Propionibacterium were assessed. The feasibility of their use to increase resistance to opportunistic microbiota, improve ruminal digestion and control acidosis in cows was shown. The dominant taxa of the rumen microbiome of dairy cows were determined, and the primers and temperature-time parameters were selected for their detection by PCR. The feasibility of using feed additives "Sporobact-K", based on bacteria of the genus *Bacillus* and "Rumibact", based on propionic acid bacteria to control opportunistic microbiota, improve scar digestion and reduce the risk of acidosis in lactating cows is shown.

Keywords: rumen microbiome, acidosis, propionic acid bacteria, spore-forming bacteria, probiotic feed additive, antagonistic activity, enzymatic activity

For citation: Sverchkova N. V., Proskurnina I. A., Letvinova V. S., Ryabaya N. E., Sachanchuk A. I., Kolomiets E. I. Effect of probiotics on the rumen microbiome of lactating cows. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 280–288 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-280-288

Введение. Микроорганизмы рубца определяют состояние здоровья и молочную продуктивность животных, поскольку являются источником ферментов, необходимых для расщепления растительных кормов, синтезируют антимикробные соединения, летучие жирные кислоты и витамины, поддерживают иммунитет, нейтрализуют токсины. В норме микробные популяции рубца действуют слаженно, их соотношение оптимально. При снижении резистентности организма размножение патогенной микробиоты в рубце становится причиной развития заболева-

ний крупного рогатого скота, снижения его продуктивности, сокращения срока хозяйственного использования, а также ухудшения качества молока.

Эффективным экологически безопасным решением указанных проблем является введение в рацион животных пробиотических кормовых добавок, обеспечивающих восстановление нормобиоты ЖКТ, улучшение ферментной и иммунной систем животных. В отличие от антибиотиков, механизм действия пробиотиков направлен не на уничтожение патогенных микроорганизмов, а на заселение кишечника конкурентоспособными штаммами бактерий, способными осуществлять контроль содержания условно-патогенной микробиоты и сдерживать проявление факторов патогенности у ее представителей [1–4].

В силу того, что значительная часть микроорганизмов рубца представлена видами, нежизнеспособными при культивировании на искусственных питательных средах, однако активными в процессах рубцовой ферментации, для их выявления следует применять методы молекулярно-генетической идентификации. Так, использование ПЦР в реальном времени расширяет возможности изучения микробиоты рубца лактирующих коров и позволяет оценить влияние на ее состав пробиотических кормовых добавок с различным механизмом действия. Это обусловливает ключевую роль указанных молекулярно-генетических методов исследования при разработке стратегий коррекции дисфункций рубца коров.

Цель работы – исследование состава микробиома рубца лактирующих коров до и после применения пробиотических кормовых добавок.

Объекты и методы исследования. Для выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров, предоставленных РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству», использовали оптимизированную методику, которая позволяет получать образцы с оптимальной чистотой и концентрацией ДНК [5].

Концентрацию ДНК в выделенных образцах определяли с помощью флуориметра Quantus (Promega, США) и наноспектрофотометра NanoDrop P330 (Implen, Германия). Чистоту выделенной ДНК оценивали по показателям A260/280 и A260/230. Проверку пригодности выделенных образцов ДНК для молекулярно-генетических исследований выполняли с помощью ПЦР с универсальными эубактериальными праймерами 8f (5′-agagtttgatcctggctcag-3′) и 1492r (5′-ggttaccttgttacgactt-3′). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 2× ПЦР Master Mix («Артбиотех», РБ) – 10 мкл, праймер 8f – 1 мкл (4 мМ), праймер 1492f – 1 мкл (4 мМ), ДНК-матрицу – 2 мкл, H_2O – до 20 мкл. Программа амплификации: 95 ºС – 3 мин (1 цикл); 95 ºС – 20 с, 55 ºС – 20 с, 72 ºС – 1 мин 30 с (34 цикла); 72 ºС – 5 мин (1 цикл); охлаждение до +4 ºС. В качестве положительных контролей использовали ДНК грамположительных (*Clavibacter michiganensis* БИМ В-1593) и грамотрицательных (*Pectobacterium carotovorum* БИМ В-88) бактерий. Отрицательным контролем служил образец, не содержащий ДНК.

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с использованием 1×трис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК окрашивали раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). В качестве стандарта для определения размера продуктов ПЦР использовали маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder 1 Kb Plus (Thermo Scientific, США). Анализ продуктов ПЦР и расчет длин фрагментов ДНК осуществляли с помощью системы документирования гелей и программного обеспечения Bio-Rad ChemiDoc MP (США).

Подбор праймеров для идентификации и количественного определения основных групп микроорганизмов – представителей симбиотической микробиоты рубца жвачных животных – осуществляли на основании данных научной литературы [6–10]. Для проверки специфичности праймеров, их модификации (в случае необходимости), расчета температуры отжига использовали онлайн-ресурсы Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), Primer3 (https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi), OligoCalc (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html).

ПЦР-РВ проводили с помощью амплификатора CFX96 Touch (BioRad, США), используя подобранные для каждой пары праймеров температурно-временные параметры. Реакционная смесь содержала 2× ПЦР Master Mix («Артбиотех», РБ), прямой и обратный праймеры (по 4 мМ каждого),

флуоресцентный краситель ZubrGreen («Праймтех», РБ), ДНК-матрицу, деионизированную воду. В качестве отрицательного контроля при проведении ПЦР использовали образец, не содержащий ДНК.

Для контроля ацидозов коров использовали кормовые добавки «Споробакт-К», с. п. на основе спорообразующих бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-497 и *Bacillus velezensis* БИМ В-713, а также «Румибакт», с. п. на основе пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii* AR16 и *Propionibacterium shermanii* R15.

В качестве тест-объектов для изучения антагонистической активности исследуемых культур использовали штаммы условно-патогенных бактерий *Escherichia coli* 39A, *E. coli* K3, *Staphylococcus aureus* 107B, *Proteus vulgaris* из коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

Антагонистическую активность спорообразующих бактерий определяли методом лунок по диаметру зон задержки и/или отсутствия роста тест-культур патогенов [11].

Определение активности эндо-1,4-ß-глюканазы (целлюлазы) проводили спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата Azo-CM-Cellulose согласно протоколу к набору реагентов Megazyme (Ирландия). Единицы активности рассчитывали по формуле

$$A = (412{,}5B - 6{,}0) \cdot 6{,}6/1\ 000,$$

где A – активность, ед. акт/мл (микромоль глюкозидных связей субстрата, гидролизуемых за 1 мин, в расчете на 1 мл жидкого препарата); B – оптическая плотность при 590 нм.

Определение активности эндо-1,4-ß-ксиланазы проводили спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата 4-O-Метил-D-глюкороно-D-ксилана, согласно методике Sigma-Aldrich (Германия). Единицы активности рассчитывали по приведенной выше формуле.

Уровень α-амилазы определяли спектрофотометрически с использованием хромогенного субстрата Red-Starch согласно методике, предложенной Megazyme (Ирландия). Единицы активности рассчитывали по формуле

$$A = (203B + 5) \cdot 2/1\ 000,$$

где A – активность, ед. акт/мл (микромоль гликозидных связей субстрата, гидролизуемых за 1 мин, в расчете на 1 мл жидкого препарата); B – оптическая плотность при 510 нм.

Активность ферментов α-галактозидазы, β-галактозидазы и β-глюкозидазы оценивали колориметрически по количеству освободившегося о-нитрофенола из о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида, 4-нитрофенил-α-D-галактопиранозида и 2-нитрофенил-β-D-глюкопиранозида. Единицы активности ферментов рассчитывали по следующей формуле:

$$A = 1\ 000OD/VT,$$

где OD – измеренные значения оптической плотности для реакционной смеси (при 420 нм для β-галактозидазы и 405 нм для α-галактозидазы и β-глюкозидазы); T – время реакции, мин; V – объем пробы культуры, взятой для определения, мл.

Для выделения целевых групп бактерий из рубца асептически отбирали 1,0 мл рубцовой жидкости, делали ряд 10-кратных разведений в физиологическом растворе (0,8 % NaCl), по 100 мкл из 10^{-4}–10^{-6} разведения высевали на питательные среды для культивирования факультативно и облигатно анаэробных бактерий: тиогликолиевую среду (Condalab, Испания), колумбийский агар (Condalab, Испания), среду для выделения бактерий рода *Clostridium* (Condalab, Испания). Посевы инкубировали при 37 °С в течение 48–72 ч. После этого отбирали морфологически отличающиеся колонии и пересевали их до получения монокультур.

Результаты и их обсуждение. Одним из важнейших этапов исследования структуры микробиома рубца является выделение метагеномной ДНК. Варьируя параметры экстракции нуклеиновых кислот, можно получить различные результаты, работая даже с одним образцом биоматериала. Это связано с различной эффективностью лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также с присутствием в рубцовой жидкости большого количества ингибиторов ферментативных реакций. В связи с изложенным выше проводилась оптимизация

метода выделения ДНК из рубцовой жидкости для последующего определения состава микробиома рубца методом ПЦР в реальном времени. Оптимизацию метода выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров проводили путем сравнительного анализа пяти протоколов, различающихся стадией разрушения бактериальных клеток (использование стеклянных шариков, детергентов) и подходом к выделению ДНК (методы ЦТАБ/ДСН, модифицированный фено-хлороформный метод, коммерческий набор «Нуклеосорб С»).

Установлено, что максимальная концентрация ДНК детектировалась в образцах, выделенных с помощью методики [5], предусматривающей предварительное осаждение бактериальных клеток из рубцовой жидкости центрифугированием, их разрушение с помощью стерильных стеклянных шариков и последующую экстракцию ДНК фенол-хлороформным методом. Применение этой же методики позволило получить «чистые» препараты ДНК по показателям соотношений 260/280 и 260/230 нм, что в совокупности определило ее выбор для дальнейших исследований.

На основании литературных данных [6–10, 12–15] определены таксоны микроорганизмов, доминирующие в рубце лактирующих коров – бактерии отделов *Bacteroidota* (син. *Bacteroidetes*), *Bacillota* (*Firmicutes*), *Pseudomonadota* (классы *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*), *Spirochaetota* (*Spirochaetes*), *Actinomycetota* (*Actinobacteria*), *Fusobacteriota* (*Fusobacteria*), *Verrucomicrobiota* (*Verrucomicrobia*), а также археи отдела *Methanobacteriota* (*Euryarchaeota*). Проведен подбор праймеров (табл. 1) к основным таксонам рубца жвачных животных, осуществлена проверка их специфичности с помощью тестирования *in silico*, а также определены температурно-временные параметры ПЦР в режиме реального времени для анализа доминирующей микробиоты рубца коров.

Таблица 1. **Перечень праймеров для выявления и количественного анализа основных таксонов микроорганизмов в рубце лактирующих коров**

Table 1. **List of primers for identification and quantitative analysis of the main taxa of microorganisms in the rumen of lactating cows**

Целевой таксон	Генетический локус	Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5′→3′	Источник
Отдел *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*)	16S рРНК	Bac960F	gtttaattcgatgatacgcgag	Yang с соавт., 2015
		Bac1100R	ttaagccgacacctcacgg	
Отдел *Bacillota* (*Firmicutes*)	16S рРНК	928F-Firm	tgaaactcaaaggaattgacg	Bacchetti De Gregoris с соавт., 2011
		1040Firm-r	accatgcaccacctgtc	
Отдел *Pseudomonadota* (Beta- и Gamma-*Proteobacteria*)	23S рРНК	PhylProt-F	gtataatgggtcagcgac	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylProt-R	cagcattcgcacttctga	
	16S рРНК	Beta979F	aacgcgaaaaaccttacctacc	Yang с соавт., 2015
		Beta1130R	tgccctttcgtagcaactagtg	
Отдел *Spirochaetota* (*Spirochaetes*)	16S рРНК	PhylSpir-F	gtcttaagcatgcaagtc	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylSpir-F	tgctgcctcccgtaggag	
Отдел *Actinomycetota* (*Actinobacteria*)	16S рРНК	ACT235f	cgcggcctatcagcttgttg	Stach с соавт., 2003
		ACT878r	ccgtactccccaggcgggg	
Отдел *Fusobacteriota* (*Fusobacteria*)	16S рРНК	PhylFus-F	gatccagcaattctgtgtgc	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylFus-R	cgaatttcacctctacacttgt	
Отдел *Verrucomicrobiota* (*Verrucomicrobia*)	16S рРНК	PhylVer-F	gaattctcggtgtagca	Hermann-Bank с соавт., 2013
		PhylVer-R	ggcattgtagtacgtgtgca	
Отдел *Methanobacteriota* (*Euryarchaeota*)	16S рРНК	gMethano-brevibac-F	cgcctaaggatgggtctgcg	Kurina с соавт., 2020
		gMethano-brevibac-R	cttgcccagctcttattccaaaagc	

В качестве референсных штаммов для тестирования специфичности праймеров выбраны штаммы бактерий *Flavobacterium* sp. БИМ В-1313, *Chryseobacterium oncorhynchi* БИМ В-1307 Г – представители отдела *Bacteroidota*; *Bifidobacterium longum* БИМ В-390, *Micrococcus luteus* БИМ В-1096 Г, *Rhodococcus ruber* БИМ В-1181 Г (отдел *Actinomycetota*); *Acinetobacter calcoaceticus* БИМ В-1683, *Escherichia coli* БИМ В-379, *Klebsiella oxytoca* БИМ В-812 Г, *Pseudomonas aeruginosa* БИМ В-807 Г (отдел *Pseudomonadota*) из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, а также бактерии *Lactobacillus paracasei* CL4, *Pediococcus acidilactici* CL2.2, *Bacillus licheniformis* CL2.1, *Staphylococcus epidermidis* К2-2 (отдел *Bacillota*), выделенные из рубца коров.

С целью идентификации основных видов физиологически значимых групп микроорганизмов, колонизирующих рубец молочных коров, и получения референсных штаммов для последующих молекулярно-генетических исследований методом накопительного культивирования на селективных средах выделено 9 штаммов бактерий лактатутилизирующих и целлюлолитических бактерий. Изучены их морфологические и культуральные свойства, методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа белковых профилей определена видовая принадлежность. На основании полученных данных три штамма отнесено к виду *Bacillus licheniformis*, остальные – к видам *Pediococcus acidilactici*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus kefiri*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli* (табл. 2).

Таблица 2. **Видовая принадлежность микроорганизмов – представителей физиологически значимых групп микробиоты рубца молочных коров**

Table 2. **Species belonging of microorganisms – representatives of physiologically significant groups of microbiota of the rumen of dairy cows**

Изолят	Предполагаемая физиологически значимая группа	Морфология колоний и клеток	Результат MALDI-TOF MC анализа
CL1.1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Ослизненные колонии с неровным краем, грамположительные спорообразующие палочки	*Bacillus licheniformis*
C2.1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Рыхлые с неровным краем колонии розового цвета, грамположительные спорообразующие палочки	*Bacillus licheniformis*
T3.1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Ослизненные с неровным краем колонии белого цвета	*Bacillus licheniformis*
CL3	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Молочно-белые колонии с ровным краем, грамположительные мелкие кокки	*Pediococcus acidilactici*
C2.2	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Полупрозрачные мелкие колонии с ровным краем, грамположительные кокки	*Pediococcus acidilactici*
CL4	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Молочно-белые колонии с ровным краем, грамположительные палочки	*Lacticaseibacillus paracasei*
T1	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Белые колонии с ровным краем, грамположительные палочки	*Lentilactobacillus kefiri*
T2	Лактатутилизирующие микроорганизмы	Вогнутые колонии матово-белого цвета, грамположительные кокки	*Streptococcus equinus*
6.4	Целлюлолитические микроорганизмы	Колонии молочно-белого цвета, блестящие, округлой формы, грамотрицательные прямые палочки	*Escherichia coli* (2.361)

Согласно данным литературы, бактерии *P. acidilactici*, наряду с *Streptococcus bovis*, рассматриваются как маркеры ацидоза у крупного рогатого скота [15] и могут использоваться в дальнейших исследованиях для оценки эффективности пробиотических кормовых добавок в профилактике данного заболевания.

Известно, что одним из способов регуляции состава микробиома рубца жвачных животных для улучшения рубцового пищеварения и повышения продуктивности молочного скота является применение пробиотических кормовых добавок. Нами в рационах лактирующих коров испытаны пробиотические кормовые добавки с различным механизмом действия. Кормовая добавка «Споробакт-К», с. п. предназначена для повышения биологической доступности кормов, иммунокоррекции и активизации процессов метаболизма при выращивании крупного рогатого скота. Основой кормовой добавки «Споробакт-К», с. п. являются клетки, споры и продукты метаболизма бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-497 и *Bacillus velezensis* БИМ В-713 (соотношение 1 : 1), адсорбированных на носителе. Титр жизнеспособных бактериальных клеток составляет не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г, диаметр зоны подавления роста патогенной микробиоты рубца крупного рогатого скота варьируется в диапазоне: для *E. coli* – 25,0–28,0 мм, для *S. aureus* – 32,0–35,0, для *P. vulgaris* – 17,0–19,0 мм. Количественная оценка ферментативной активности кормовой добавки показала, что протеазная, целлюлазная и ксиланазная активность составляет 19,3 ± 0,13; 2,1 ± 0,083 и 5,2 ± 0,02 ед/мл соответственно.

Выживаемость бактериального консорциума, являющегося основой Споробакта-К, с. п., спустя 12 ч в искусственном желудочном соке (pH 2.0, пепсин) составляет более 80 %, под действием

желчи (2–10 %) – 100 %. Последовательное воздействие на консорциум бактерий кислой среды в присутствии пепсина в течение 4 ч и последующее помещение в 10%-й желчный раствор (pH 8,0) на 12 ч приводит к незначительной (на 15 %) потере жизнеспособности клеток. Комплексная ферментативная активность и устойчивость бактерий-антагонистов *B. velezensis* БИМ В-497 Д и *B. velezensis* БИМ В-713 Д к низкой кислотности среды и желчи позволяет рассматривать «Споробакт-К», с. п. как перспективную кормовую добавку для контроля ацидозных состояний крупного рогатого скота.

Кормовая добавка «Румибакт», с. п. для профилактики и лечения ацидозов жвачных животных разработана на основе пропионовокислых бактерий (титр не менее $2{,}0 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г), которые являются природными компонентами рубца травоядных животных и способны утилизировать лактат. «Румибакт», с. п. обеспечивает нормализацию рубцового пищеварения, препятствует развитию ацидозов у продуктивных коров за счет конверсии молочной кислоты в пропионовую. Использование добавки «Румибакт», с. п. позволяет оптимизировать pH содержимого рубца, снизить риск заболевания животных ламинитами, повысить активность рубцовой микробиоты, улучшить суточную продуктивность животных.

Пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii* AR16 и *Propionibacterium shermanii* R15, составляющие основу кормовой добавки «Румибакт», с. п., характеризуются высокой колониеобразующей активностью при культивировании на различных питательных средах. Для штамма *Pr. shermanii* AR16 характерным является активный рост в условиях повышенной кислотности на среде с молочной кислотой, что позволяет прогнозировать его высокую конкурентоспособность в микробоценозе рубца (табл. 3).

Таблица 3. **Жизнеспособность бактерий *P. shermanii* AR16 и *P. shermanii* R15 на различных питательных средах**

Table 3. **Viability of bacteria *P. shermanii* AR16 and *P. shermanii* R15 on different nutrient media**

Среда культивирования	pH	Штамм	Титр, КОЕ/мл
MRS, глюкоза	7,2	*P. shermanii* AR16	$1{,}5 \cdot 10^{9}$
		P. shermanii R15	$1{,}0 \cdot 10^{10}$
ПКБ, глюкоза	7,2	*P. shermanii* AR16	$1{,}0 \cdot 10^{9}$
		P. shermanii R15	$2{,}1 \cdot 10^{9}$
ПКБ, глюкоза + молочная кислота	5,5	*P. shermanii* AR16	$2{,}0 \cdot 10^{8}$
		P. shermanii R15	$1{,}0 \cdot 10^{5}$

Кроме лактатутилизирующей способности, штаммы пропионовокислых бактерий *Pr. shermanii* AR16 и *Pr. shermanii* R15 способны продуцировать пропионовую кислоту, витамины группы В, обладают α-галактозидазной (16–166 ед/мл), β-галактозидазной (42–166 ед/мл), β-глюкозидазной (54–433 ед/мл) активностью.

Таким образом, пробиотическая кормовая добавка «Румибакт», с. п., способная утилизировать избыток молочной кислоты в рубце и превращать ее в пропионовую, представляет несомненный интерес для коррекции дисфункций рубца коров и может использоваться совместно с кормовой добавкой «Споробакт-К», с. п. в качестве средства для профилактики лактатного ацидоза.

С помощью ПЦР в режиме реального времени в предоставленных сотрудниками РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» образцах рубцовой жидкости лактирующих коров исследована динамика содержания функционально значимых групп микроорганизмов после введения в рацион комбинации пробиотических кормовых добавок «Споробакт-К», с. п. и «Румибакт», с. п. в количестве 1,0 и 0,02 г соответственно на 1 кг комбикорма.

Проанализировано количественное содержание функционально значимых групп микроорганизмов – грамотрицательных бактерий отдела *Bacteroidota* и грамположительных бактерий отдела *Bacillota*; условно-патогенных бактерий *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*; целлюлолитических бактерий *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*; амилолитических бактерий *Lactobacillus* sp., *Prevotella albensis*, лактатутилизирующих бактерий *Selenomonas ruminantium*, изменение численности которых, согласно литературным данным [12–15], может влиять на развитие лактатного

ацидоза. Показано, что на протяжении периода исследования в структуре микробных сообществ рубцов опытных животных не выявлялись изменения, связанные с развитием лактатного ацидоза. Применение пробиотических добавок на основе бактерий *Bacillus* и *Propionibacterium* в составе кормов закономерно повысило количество представителей *Bacillota* и *Bacteroidota* у животных опытной группы. Отмечалось также увеличение относительного содержания бактерий отделов *Pseudomonadota* и *Fusobacteriota* и снижение количества бактерий отдела *Actinomycetota* ($p < 0,05$). Относительное содержание амилолитических бактерий *S. ruminantium* оставалось стабильным, *Prevotella albensis* – снижалось, *Lactobacillus* sp. – несколько увеличивалось, а бактерий отделов *Verrucomicrobiota*, *Spirochaetota* и метаногенных архей отдела *Euryarchaeota* менялось незначительно. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии фактора риска развития ацидозного состояния. Важным критерием эффективности использования пробиотических бактерий является также статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение доли патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в микробиоте рубца животных экспериментальной группы. Так, количество бактерий *E. coli* и *S. aureus* снижалось у 60 % опытных коров, тогда как у 80 % коров контрольной группы, получавших стандартный рацион, количество бактерий *Staphylococcus* sp. достоверно повышалось. Во время эксперимента отмечен также сдвиг показателя кислотности рубцовой жидкости в нейтральную область (7,0–7,3), что является важным фактором профилактики развития лактатного ацидоза.

Применение в рационах лактирующих коров указанных добавок, а также доломитовой муки (10 кг/т) в качестве буфера способствовало интенсификации процессов пищеварения и росту молочной продуктивности животных – отмечалось повышение поедаемости грубых кормов, переваримости питательных веществ корма (снижение кормовых затрат на получение 1 кг молока на 7,4 %), увеличение удоя молока натуральной (на 6,1 %) и базисной (на 6,5 %) жирности, а также улучшение его качественного состава (повышение содержания белка и жира на 0,02 %).

Заключение. Оптимизированы методы выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости молочных коров, позволяющие получить препараты нуклеиновых кислот высокой чистоты без ингибиторов ПЦР, пригодные для молекулярно-генетических исследований. Подобраны праймеры для определения доминирующих таксонов микробиома рубца – бактерий отделов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* (классы *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* и архей отдела *Euryarchaeota.* Определены температурно-временные параметры проведения ПЦР-РВ для качественного и количественного анализа таксономического состава микробиома рубца.

Показано, что комплексное применение кормовых добавок «Споробакт-К» (на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*) и «Румибакт» (на основе пропионовокислых бактерий рода *Propionibacterium*) позволяет регулировать состав микробиоты рубца, контролировать численность патогенных бактерий, нормализовать показатель кислотности рубцовой жидкости со сдвигом в нейтральную область и обеспечивать профилактику лактатного ацидоза, повышать усвояемость трудногидролизуемых кормов за счет продукции широкого спектра гидролитических ферментов. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности их использования для повышения резистентности животных к условно-патогенной микробиоте, улучшения рубцового пищеварения, повышения молочной продуктивности и профилактики ацидоза у коров.

Список использованных источников

1. Лаптев, Г. Ю. Микробиом рубца жвачных: современные представления / Г. Ю. Лаптев, Л. А. Ильина, В. В. Солдатова // Животноводство России. – 2018. – № 10. – С. 38–42.

2. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова [и др.] // Уч. записки Казан. ун-та. Сер. естеств. науки. – 2017. – № 1 (159). – С. 85–107.

3. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О. В. Федорова [и др.] // Вестн. технолог. ун-та. – 2016. – Т. 15, № 19. – С. 170–174.

4. Сверчкова, Н. В. Критерии отбора и характеристика штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* – основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для животноводства / Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 105–113.

5. Оптимизация метода выделения метагеномной ДНК из рубцовой жидкости лактирующих коров / В. С. Летвинова [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. Дню белорус. науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, Витебск, 15–16 декабря 2022 г. / редкол.: Н. И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2023. – С. 160–162.

6. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments / J. E. M. Stach [et al.] // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5, N 10. – P. 828–841. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x

7. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities / M. Mühling [et al.] // ISME J. – 2008. – Vol. 2, N 4. – P. 379–392. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97

8. The Gut microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity / M. L. Hermann-Bank [et al.] // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – Art. 788. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-788

9. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa / T. Bacchetti de Gregoris [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2011. – Vol. 86, N 3. – P. 351–356. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010

10. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa / I. Kurina [et al.] // Mol. Cell. Probes. – 2020. – Vol. 52. – Art. 101570. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101570

11. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии: учеб. пособие / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

12. Исследование микробиома рубца у овец с использованием молекулярно-генетических методов (обзор) / Е. М. Колоскова [и др.] // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2020. – № 4. – С. 5–26.

13. Лаптев, Г. Ю. Микробиом рубца – основа здоровья коров / Г. Ю. Лаптев, Е. А. Йылдырым, Л. А. Ильина // Животноводство России. – 2020. – № 4. – С. 42–45.

14. Мирошникова, М. С. Основные представители микробиома рубца / М. С. Мирошникова // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103, № 4. – С. 174–185.

15. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid / M. A. Cobos [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2011. – Vol. 90, N 1. – P. 26–30. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.006

References

1. Laptev G., Il'ina L., Soldatova V. Ruminal microbiome of ruminants: modern concepts. *Zhivotnovodstvo Rossii* [Animal husbandry in Russia], 2018, no. 10, pp. 38–42 (in Russian).

2. Feoktistova N. V., Mardanova A. M., Khadieva G. F., Sharipova M. R. Probiotics based on bacteria of genus *Bacillus* in poultry breeding. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki* [Scientific notes of Kazan University. Series Natural Sciences], 2017, vol. 159, no. 1, pp. 85–107 (in Russian).

3. Fedorova O. V., Nazmieva A. I., Nuretdinova E. I., Valeeva R. T. Probiotic preparations based on microorganisms of the genus *Bacillus. Vestnik tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Technological University], 2016, vol. 15, no. 19, pp. 170–174 (in Russian).

4. Sverchkova N. V., Kolomiets E. I. Selection criteria and characterization of sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* – the basis of probiotic preparations and feed additives for livestock. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 105–113 (in Russian).

5. Letvinova V. S., Bareiko A. A., Sidorenko A. V., Sverchkova N. V. Optimization of the method for isolating metagenomic DNA from the ruminal fluid of lactating cows. *Aktual'nye problemy infektsionnoi patologii zhivotnykh i puti ikh resheniya: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi Dnyu Belorusskoi nauki i 95-letiyu kafedry epizootologii i infektsionnykh boleznei (Vitebsk, 15–16 dekabrya 2022 goda)* [Current problems of infectious pathology of animals and ways to solve them: Proceedings of the International scientific and practical conference dedicated to the Day of Belarusian Science and the 95th anniversary of the Department of Epizootology and Infectious Diseases (Vitebsk, December 15–16, 2022)]. Vitebsk, 2023, pp. 160–162 (in Russian).

6. Stach J. E. M., Maldonado L. A., Ward A. C., Goodfellow M., Bull A. T. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, vol. 5, no. 10, pp. 828–841. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00483.x

7. Mühling M., Woolven-Allen J., Murrell J. C., Joint I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal*, 2008, vol. 2, no. 4, pp. 379–392. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97

8. Hermann-Bank M. L., Skovgaard K., Stockmarr A., Larsen N., Mølbak L. The Gut microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics*, 2013, vol. 14, art. 788. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-788

9. Bacchetti de Gregoris T., Aldred N., Clare A. S., Burgess J. G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, vol. 86, no. 3, pp. 351–356. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010

10. Kurina I., Popenko A. S., Klimenko N., Koshechkin S., Chuprikova L., Filipenko M., Tyakht A., Alexeev D. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, vol. 52, art. 101570. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101570

11. Tepper E. Z., Shil'nikova V. K., Pereverzeva G. I. *Practical studies in microbiology: a manual*. Moscow, Drofa Publ., 2004. 256 p. (in Russian).

12. Koloskova E. M., Ostrenko K. S., Ezerskii V. A., Ovcharova A. N., Belova N. V. Studies of the sheep rumen microbiome using molecular genetic methods: a review. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals], 2020, no. 4, pp. 5–26 (in Russian).

13. Laptev G., Iyldyrym E., Il'ina L. Rumen microbiome is the basis of cow health. *Zhivotnovodstvo Rossii* [Animal husbandry in Russia], 2020, no. 4, pp. 42–45 (in Russian).

14. Miroshnikova M. S. The main representatives of the rumen microbiome. *Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo* [Livestock and forage production], 2020, vol. 103, no. 4, pp. 174–185 (in Russian).

15. Cobos M. A., Ley de Coss A., Ramirez N. D., Gonzalez S. S., Ferrera Cerrato R. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in Veterinary Science*, 2011, vol. 90, no. 1, pp. 26–30. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.006

Информация об авторах

Сверчкова Наталья Владимировна – канд. биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sverchkova@biotech.bas-net.by

Проскурнина Ирина Александровна – заведующий лабораторией. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sverchkova@biotech.bas-net.by

Летвинова Вероника Сергеевна – аспирант. Инсти-тут общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН (ул. Губки-на, 3, 117971, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: miranikki@yandex.by

Рябая Наталья Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: microbio@mbio.bas-net.by

Саханчук Анна Ивановна – канд. с.-х. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству (ул. Фрунзе, 11, 222160, г. Жодино, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: info@belniig.by

Коломиец Эмилия Ивановна – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220085, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@biotech.bas-net.by

Information about the authors

Natalia V. Sverchkova – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Chief Researcher. State Scientific and Production Association "Chemical Synthesis and Biotechnology" (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sverchkova@biotech.bas-net.by

Irina A. Proskurnina – Head of the Laboratory. State Scientific and Production Association "Chemical Synthesis and Biotechnology" (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pros@biotech.bas-net.by

Veronika S. Letvinova – Postgraduate student. N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences (3, Gubkin Str., 117971, Moscow, Russian Federation). E-mail: miranikki@yandex.by

Natalia E. Ryabaya – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: microbio@mbio.bas-net.by

Anna I. Sachanchuk – Ph. D. (Agricult.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Livestock (11, Frunze Str., 222160, Zhodino, Minsk district, Republic of Belarus). E-mail: info@belniig.by

Emiliya I. Kolomiets – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. State Scientific and Production Association "Chemical Synthesis and Biotechnology" (2, Kuprevich Str., 220085, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@biotech.bas-net.by