

Р.В. НЕКРАСОВ¹, Н.А. МЕЛЕШКО¹, Л.А. ИЛЬИНА², Г.Ю. ЛАПТЕВ²,
Н.А. ГОЛОВНЕВА³, Н.А. УШАКОВА⁴

ВЛИЯНИЕ КОРМОВОГО ПРОБИОТИКА НА СОСТАВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА РУБЦА ТЕЛЯТ, ИХ ПИЩЕВАРЕНИЕ И ПРОДУКТИВНОСТЬ

¹ГНУ «Всероссийский институт животноводства Россельхозакадемии»

²ООО «Научно-производственная компания «Биотроф»

³ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»

⁴ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН»

Введение. По современным представлениям в пищеварительном тракте жвачных обитает примерно 600 видов бактерий [1, 2]. Изменение состава кормов в рационе приводит к перестройке соотношения отдельных видов микроорганизмов в экосистеме желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) крупного рогатого скота, а следовательно, к изменению направленности биохимической деятельности микрофлоры и изменению продуктивности животных. Поэтому большой интерес представляет изучение состава микробного сообщества жвачных и роли каждого конкретного микроорганизма в процессах пищеварения. Создание метагеномных методов анализа структуры микробного сообщества позволило обнаружить присутствие в составе микрофлоры значительного количества некультивируемых форм с неизученной метаболической активностью [3, 4]. Современные технологии дают также возможность углубленного изучения механизмов воздействия на организм и его микросимбионтов пробиотических бактерий, оценить характер межмикробных отношений внутри кишечной экосистемы. Не вызывает сомнений, что пробиотики – живые микробные добавки, которые оказывают благоприятное действие на организм животного путем улучшения кишечного микробного баланса, стимулируют обменные и иммунные процессы [5]. Способность пробиотиков оказывать многофункциональное воздействие на физиологию и метаболизм хозяина и взаимодействовать с различными симбиотическими обитателями экосистемы ЖКТ во многом определяется их совместимостью с резидентными бактериями. Лимитирующими факторами являются достаточное количество и состояние метаболической активности пробиотика при достижении им места обитания в соответствующем отделе ЖКТ, что может обеспечиваться созданием устойчивых к неблаго-

приятным условиям окружающей среды форм пробиотика. Присутствие иммунной системы хозяина, которая может быть индуцирована и потенциально атаковать развивающиеся клетки пробиотика, также вызывает необходимость их защиты [6]. Перспективное направление получения защищенных пробиотиков повышенной биологической эффективности связано с разработкой биотехнологий образования пробиотиками биопленок на твердом носителе.

Целью работы явилось изучение влияния на микробное сообщество рубца бычков, их пищеварение и продуктивность вегетативных клеток пробиотика *Bacillus subtilis*, полученных в виде биопленки на фитоносителе, с помощью молекулярно-генетического метода – T-RFLP-анализа.

Материал и методика исследований. В работе использовали вегетативные клетки *Bacillus subtilis* В-8130 для получения не содержащего споры пробиотического препарата на фитоносителе по способу [7]. Количество клеток бациллы, КОЕ/г определяли методом предельных разведений.

Из телят экспериментального хозяйства ГНУВИЖ «Кленово-Чегодаево», отделение «Дубровицы» в возрасте 25-30 дней методом аналогов были составлены 2 группы по 10 особей: I контрольная и II опытная. Животные I контрольной группы получали стартерный комбикорм. В состав комбикорма для II опытной группы дополнительно вводили 0,1 % пробиотика на основе *B. subtilis*, количество клеток бациллы в препарате составляло $4,8 \times 10^8 \pm 10$ % КОЕ/г, а в смеси с комбикормом – соответственно, $4,8 \times 10^{11} \pm 10$ % КОЕ на 1 т комбикорма. В течение 105 дней научно-хозяйственного опыта осуществляли ежедневный учет задаваемых кормов и их остатков для выяснения влияния пробиотика на поедаемость кормов и их затрат на единицу прироста живой массы тела. Для контроля за живой массой телят проводили их индивидуальное взвешивание при постановке и снятии с опыта, а также ежемесячно в период проведения научно-хозяйственного опыта. По данным взвешиваний рассчитывали общие и среднесуточные приросты. На фоне научно-хозяйственного опыта провели балансовый опыт по определению переваримости и использования питательных веществ рациона на 6 животных (по 3 особи из каждой группы) в возрасте 4,5 месяцев согласно методическим рекомендациям ВИЖ [8].

Полученные в опыте материалы были обработаны биометрически с использованием t-критерия Стьюдента.

Видовой состав микробного сообщества рубца исследовали у 3 типичных по росту и развитию бычков из каждой группы методом T-RFLP-анализа (terminal restriction fragment length polymorphism) [9].

Данный метод основан на исследовании вариабельности консервативных участков генома микроорганизмов и заключается в выделении из содержимого желудочно-кишечного тракта ДНК всех находящихся там бактерий, увеличении ее количества с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), ферментативном расщеплении ДНК на фрагменты и разделении их на автоматическом секвенаторе.

Таксономическую принадлежность бактерий определяли в соответствии с длинами терминальных фрагментов гена с помощью программы *Fragment Sorter*. Вычисление размеров пиков и их площади проводили с использованием программного блока *Fragment Analysis* (Beckman Coulter). Для идентификации пиков, T-RFLP-граммы обрабатывали с помощью программы *Fragment Sorter* [10].

Результаты эксперимента и их обсуждение. В составе микробиоценоза рубца бычков контрольной группы в возрасте 4 месяцев, когда животные перешли полностью на растительный рацион [11], и, следовательно, у них в основном сформировался состав микробного сообщества, по данным T-RFLP-анализа, представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Состав микроорганизмов в рубце бычков, %

Микроорганизм	Группа животных	
	I контроль	II опытная
1	2	3
Phylum Bacteroidetes	11,15 ± 2,88	8,99 ± 1,2
Uncultured Bacteroidetes	0,54 ± 0,24	1,22 ± 0,58
Family Bacteroidaceae	1,48 ± 0,99	0,87 ± 0,17
Family Flavobacteriaceae	5,74 ± 2,41	4,24 ± 0,54
Family Flexibacteraceae	2,98 ± 0,73	2,53 ± 0,42
Family Prevotellaceae	0,42 ± 0,56	0,14 ± 0,1
Family Thermoanaerobacteriaceae	1,00 ± 0,06	10,79 ± 3,28*
Family Clostridiaceae	9,99 ± 1,35	7,15 ± 2,02
Family Eubacteriaceae	5,79 ± 1,7	7,83 ± 2,2
Family Lachnospiraceae	25,93 ± 1,41	21,27 ± 5,44
Family Peptostreptococcaceae	0,06 ± 0,08	0,77 ± 0,05***
Family Ruminococcaceae	4,83 ± 0,74	2,89 ± 0,26*
Family Veillonellaceae	5,54 ± 0,62	5,05 ± 0,34
Order Bacillales	1,7 ± 0,33	3,48 ± 0,97
Family Bacillaceae	1,46 ± 0,41	2,8 ± 0,3
Family Alicyclobacillaceae	0,05 ± 0,02	0,45 ± 0,52
Family Paenibacillaceae	0,2 ± 0,1	0,24 ± 0,17
Order Lactobacillales	0,32 ± 0,15	0,42 ± 0,21
Family Lactobacillaceae	0,32 ± 0,15	0,42 ± 0,21
Family Enterococcaceae	0	0

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Family Bifidobacteriaceae	1,37 ± 0,29	0,4 ± 0,14*
Family Pseudomonadaceae	1,52 ± 0,45	2,99 ± 1,72
Family Burkholderiaceae	0,63 ± 0,41	1,17 ± 0,05
Family Enterobacteriaceae	1,93 ± 0,86	2,63 ± 0,14
Phylum Actinobacteria	9,27 ± 1,95	8,08 ± 0,72
Family Staphylococcus	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,07
Family Helicobacteraceae	0,28 ± 0,37	0
Phylum Fusobacteria	1,53 ± 0,24	0,81 ± 0,25*
Phylum-level unclassified bacteria	16,74 ± 1,77	15,21 ± 0,49

Достоверно при: *- P<0,05, **- P<0,1, ***- P<0,001

Выявлено доминирование представителей Сем. *Lachnospiraceae* (25,93±1,41 %); примерно в равных долях присутствовали члены Филы *Bacteroidetes* (11,15±2,88 %), Филы *Actinobacteria* (9,27±1,95 %) и Сем. *Clostridiaceae* (9,9±1,35 %). По 5-6 % от общего количества форм составляли бактерии семейств *Eubacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Ruminococcaceae*. Относительно высокой определилась доля бацилл Сем. *Bacillaceae* (1,46±0,41 %). Практически столько же оказалось представителей бактерий Сем. *Bifidobacteriaceae*, Сем. *Enterobacteriaceae*, Сем. *Pseudomonadaceae*, Филы *Fusobacteria*. Количественное содержание бактерий остальных идентифицированных групп было существенно менее 1%. Незначительной была численность лактобацилл Сем. *Lactobacillaceae* (0,32±0,15 %). Значительная часть микроорганизмов в рубце животных являлись некультивируемыми. Их доля составила 16,74±1,77 %.

Выявленный примененным методом состав микробного сообщества в рубце характеризует процессы пищеварения в этом отделе ЖКТ, которые в принципе соответствуют физиологическому состоянию молодых животных, перешедших с молочной на растительную диету [9]: расщепление клетчатки связано с массовым развитием целлюлозолитических бактерий Сем. *Lachnospiraceae*, филы *Bacteroidetes*, Сем. *Ruminococcaceae*, обладающих также и амилолитической активностью. Ферментация сложных и простых углеводов кормов обеспечена жизнедеятельностью представителей семейств *Clostridiaceae* и *Eubacteriaceae*. Относительно низкая численность лактобацилл и бифидобактерий может быть связана с возрастными особенностями теллят, период развития которых в момент взятия проб содержимого рубца характеризовался приоритетным развитием целлюлолитических микроорганизмов.

Вегетативные клетки *Bacillus subtilis* В-8130, введенные в организм

бычков с кормами, вызвали естественное достоверное увеличение доли бактерий Сем. *Bacillaceae* с $1,46 \pm 0,41$ % до $2,8 \pm 0,3$ %, а также способствовали изменениям в соотношении отдельных представителей микробного сообщества рубца: практически на порядок возросла численность целлюлолитиков *Thermoanaerobacteriaceae*, а также *Peptostreptococcaceae*, *Alicyclobacillaceae*. В среднем в 2 раза увеличилось количество некультивируемых *Bacteroidetes* и *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*. Можно отметить достоверное уменьшение способных вызвать некробактериоз *Fusobacteria*, а Сем. *Helicobacteraceae* у животных опытной группы вообще не определялось в отличие от контроля, в рубце которых доля данного патогена составляла $0,28 \pm 0,37$ %.

Сравнение состояния микрофлоры рубца с показателями рубцового пищеварения, динамикой, приростом живой массы животных и затратами кормов на единицу продукции, а также коэффициентами переваримости питательных веществ показало, что обнаруженные изменения в микробном сообществе, вызванные введением в рацион пробиотика на основе *B.subtilis*, оказали положительное влияние на все перечисленные показатели. Возросла интенсивность рубцового пищеварения за счет увеличения общего количества бакмассы, включая инфузории и бактерии (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели процессов рубцового пищеварения

Группа	Показатель					
	рН	Аммиак, мг%	ЛЖК, моль /100 мл	Бакмасса, г СВ/100 мл		
				Инфу- зории	Бак- терии	Общее коли- чество
I контрольная	6,78 $\pm 0,02$	18,12 $\pm 0,02$	11,24 $\pm 0,03$	1,34 $\pm 0,04$	0,40 $\pm 0,02$	1,74 $\pm 0,03$
II опытная	6,93 $\pm 0,04$	20,86 $\pm 0,04$	12,44 $\pm 0,04$	1,87 $\pm 0,05$	0,52 $\pm 0,02$	2,39 $\pm 0,05$

Увеличилось образование летучих жирных кислот, аммиака, рН приблизился к нейтральному значению. Повысилась переваримость всех компонентов корма: сухого и органического вещества, протеина, жира, клетчатки, БЭВ (таблица 3).

Таблица 3 – Коэффициенты переваримости питательных веществ (%) (M±m, n=3)

Питательные вещества	Группа бычков	
	I контрольная	II опытная
Сухое вещество	65,8±0,79	68,5±1,91
Органическое вещество	77,3±0,55	80,2±1,19*
Протеин	73,5±0,41	76,3±0,54**
Жир	51,9±2,80	57,1±2,19
Клетчатка	50,1±3,54	53,0±2,12
БЭВ	79,9±1,10	82,2±1,42

Валовой и среднесуточный прирост живой массы увеличился на 13,1 %, по сравнению с контролем (таблица 4).

Таблица 4 – Динамика и прирост живой массы телят и затраты кормов на единицу продукции (M±m, n=10)

Показатель	Группа	
	I контрольная	II опытная
Живая масса, кг:		
на начало опыта	44,5±3,46	44,9±2,40
в конце опыта	122,9±3,31	133,6±3,67*
в % к контролю	100,0	108,7
Валовой прирост, кг	78,4±2,63	88,7±3,92*
в % к контролю	100,0	113,1
Среднесуточный прирост, г	753,9±25,25	852,9±37,65*
в % к контролю	100,0	113,1
На 1 кг прироста затрачено:		
обменной энергии, МДж	35,3	33,3
сухого вещества, кг	2,92	2,78
сырого протеина, г	566,5	537,3
переваримого протеина, г	416,4	410,0
комбикорма, кг	1,64	1,56

Заключение. С помощью T-RFLP-анализа состава микробного сообщества рубца бычков в возрасте 4,5 месяцев показано положительное влияние защищенных вегетативных клеток пробиотика *Bacillus subtilis* на микрофлору, выразившееся в увеличении общего количества бактерий, а также содержания целлюлолитических, амилолитических и протеолитических микросимбионтов. Эти изменения вызвали повышение интенсивности пищеварения и способствовали увеличению продуктивности животных.

Литература

1. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б. А. Шендеров // Микрофлора человека и животных и ее функции. – М. : Гранат, 1998. – Т. 1. – С. 35-39.
2. Тараканов, Б. В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птиц / Б. В. Тараканов. – М. : Научный мир, 2006. – 188 с.
3. Guarner, F. Gut flora in health and disease / F. Guarner, J. R. Malagelada // The Lancet. – 2003. – Vol. 361, Issue 9356. – P. 512-519.
4. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome / S. R. Gill [et al.] // Science. – 2006. – Vol. 312, № 5778. – P. 1355-1359.
5. Шендеров, Б. А. Функциональное питание и пробиотики: микроэкологические аспекты / Б. А. Шендеров, М. А. Манвелова. – М. : Агар, 1997. – 24 с.
6. Prakash, S. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics / S. Prakash [et al.] // Biologics: Targets & Therapy. – 2011. - № 5. – P. 71-86.
7. Способ получения биологически активной кормовой добавки : патент РФ № 2346463 / Н. А. Ушакова [и др.]. – заявл. 20.03.2007; опубл. 20.02.2009., Бюл. № 5. – 4 с.
8. Томмэ, М. Ф. Методика определения переваримости кормов и рационов / М. Ф. Томмэ. – М., 1969. – 39 с.
9. Исследование бактериального сообщества рубца коров с помощью T-RFLP-анализа / Л. А. Ильина [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. – 2011. - № 2. – С. 24-27.
10. Fragment Sorter // Ohio Agricultural Research and Development Center [Электрон. ресурс]. – Wooster, 2009. – Режим доступа : <http://www.oardc.ohio-state.edu/trflpfragsort/index.php>
11. Курилов, Н. В. Физиология и биохимия пищеварения жвачных / Н. В. Курилов, А. П. Краткова. – М. : Колос, 1971. – 432 с.

(поступила 5.03.2012 г.)

УДК 636.2.087.72:636.2.033

В.Ф. РАДЧИКОВ¹, В.К. ГУРИН¹, И.В. СУЧКОВА², В.В. БУКАС²,
Д.В. ГУРИНА¹, В.С. СЕРГУЧЕВ¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ РАЦИОНОВ ТЕЛЯТАМИ ПРИ СКАРМЛИВАНИИ СЕЛЕНА В СОСТАВЕ КОМБИКОРМА КР-1

¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины»

Введение. Важным фактором повышения продуктивности сельскохозяйственных животных является их полноценное кормление, орга-