

УДК 579.262

## ВЛИЯНИЕ *BACILLUS SUBTILIS* НА МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО РУБЦА И ЕГО ЧЛЕНОВ, ИМЕЮЩИХ ВЫСОКИЕ КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ПИЩЕВАРЕНИЯ, РОСТА И РАЗВИТИЯ ХОЗЯИНА

© 2013 г. Н. А. Ушакова<sup>\*</sup>,<sup>1</sup>, Р. В. Некрасов<sup>\*\*</sup>, Н. А. Мелешко<sup>\*\*</sup>, Г. Ю. Лаптев<sup>\*\*\*</sup>,  
Л. А. Ильина<sup>\*\*\*</sup>, А. А. Козлова<sup>\*</sup>, А. В. Нифатов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва

<sup>\*\*</sup>ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии, Московская обл., Дубровицы

<sup>\*\*\*</sup>ООО Научно-производственная компания “Биотроф”, Санкт-Петербург, Колпино

Поступила в редакцию 10.04.2012 г.

Исследования состава микробного сообщества рубцовой жидкости бычков методом T-RFLP-анализа показали, что введение с кормами массы защищенных биопленкой клеток *Bacillus subtilis* вызвало изменения в микробиоценозе. У контрольных животных, перешедших с молочной на растительную диету, доминировали бактерии филума *Firmicutes* (55.11 ± 1.97%), класса *Clostridia* (53.10 ± 2.06%), с основной долей семейств *Lachnospiraceae* (25.93 ± 1.41%) и *Clostridiaceae* (9.90 ± 1.35%). Присутствовали члены филума *Bacteroidetes* (11.15 ± 2.88%) и филума *Actinobacteria* (9.27 ± 1.95%). Доля некультивируемых форм составила 17.28 ± 2.01%. Содержание бацилл сем. *Vacillaceae* было менее двух процентов (1.46 ± 0.41%). Попадание в рубец опытных животных клеток *B. subtilis* вызвало увеличение доли сем. *Vacillaceae* до 2.80 ± 0.30%. На порядок выросла численность *Thermoanaerobacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Alicyclobacillaceae*. В 2 раза увеличилось количество *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, некультивируемых *Bacteroidetes*. Повысились показатели эффективности пищеварения – увеличилось количество рубцовых бактерий и простейших, летучих жирных кислот, выделение аммиака. Ряд семейств, в том числе доминирующих, включал представителей с различной направленностью корреляционных связей с показателями рубцового пищеварения. Введенные бациллы стимулировали те фило-типы, которые имели положительные коэффициенты корреляции, и ингибировали формы, связи которых были отрицательными – произошла перестройка микробной экосистемы содержимого рубца в сторону повышения положительного влияния на пищеварение. Обсуждается функциональная роль членов микробного сообщества, корреляционные связи которых отрицательны, слабо связаны или не связаны с показателями рубцового пищеварения.

**Ключевые слова:** симбиотические взаимодействия, микробное сообщество, молекулярно-генетический метод, T-RFLP-анализ, корреляционные связи.

DOI: 10.7868/S0026365613040125

Развитие фундаментальных исследований симбиотических взаимодействий организма и его микробиоты получило новое направление в связи с созданием метагеномных методов анализа структуры микробного сообщества [1, 2], среди которых одним из наиболее достоверных является метод T-RFLP [3]. Современные технологии дают возможность углубленного изучения механизмов воздействия различных факторов на организм хозяина и его микросимбионтов, позволяют оценить характер межмикробных отношений, в том числе, внутри кишечной экосистемы, например,

при поступлении в организм массы посторонних бактерий в составе биологически активных кормовых добавок. Большой теоретический и практический интерес представляют технологии получения нового поколения таких добавок, связанные с образованием биопленок на твердом носителе. Биопленки в природе играют защитную роль для образующих их бактерий [4–6]. Поэтому получение биопленки позволяет повысить выживаемость микробной популяции в неблагоприятных условиях высушивания, грануляции и т.п., и клетки, закрепленные на частицах твердого носителя, могут активно влиять на микробный ценоз желудочно-кишечного тракта.

<sup>1</sup> Автор для корреспонденции (e-mail: naushakova@gmail.com).

Цель настоящей работы – с помощью метода T-RFLP-анализа, модифицированного для исследований рубцовых бактерий [7], изучить микробное сообщество рубцовой жидкости бычков, перешедших с молочной на растительную диету; исследовать влияние вегетативных клеток *Bacillus subtilis*, поступивших с кормами в организм молодых животных в виде биопленки на фитоносителе, на микробную экосистему химуса рубца и межмикробные взаимодействия внутри нее; оценить изменения количества отдельных представителей микробиоты, обладающих высокими коэффициентами корреляционных связей с показателями пищеварения, ростом и развитием хозяина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штамм *Bacillus subtilis* В-8130. Твердофазное культивирование бактерий проводили на измельченных листьях облепихи [8] при 50% влажности массы, которую по окончании ферментации высушивали при 45°C до воздушно сухого состояния. Количество клеток бациллы (КОЕ/г) определяли методом предельных разведений. Отсутствие спор контролировали световой микроскопией фиксированных мазков водных суспензий препарата, окрашенных генцианвиолетом, с использованием микроскопа Ах-иоскоп (“Zeiss”, Germany) и компьютерной системы анализа изображений KS 300.

Электронную микроскопию осуществляли при помощи сканирующего электронного микроскопа CamScan MB2300 (Чехия). Для этого на покровное стекло ( $S = 18 \times 18$  мм) помещали каплю изотонического (0.5 М) раствора сахарозы [9] и сверху осторожно насыпали сырую ферментационную массу, содержащую бактериальные клетки. Высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение суток. Стекла прикрепляли с помощью двухсторонней проводящей углеродной ленты к поверхности манипуляционного столика. Препараты напыляли золотом под вакуумом согласно стандартной процедуре приготовления препаратов для электронной сканирующей микроскопии.

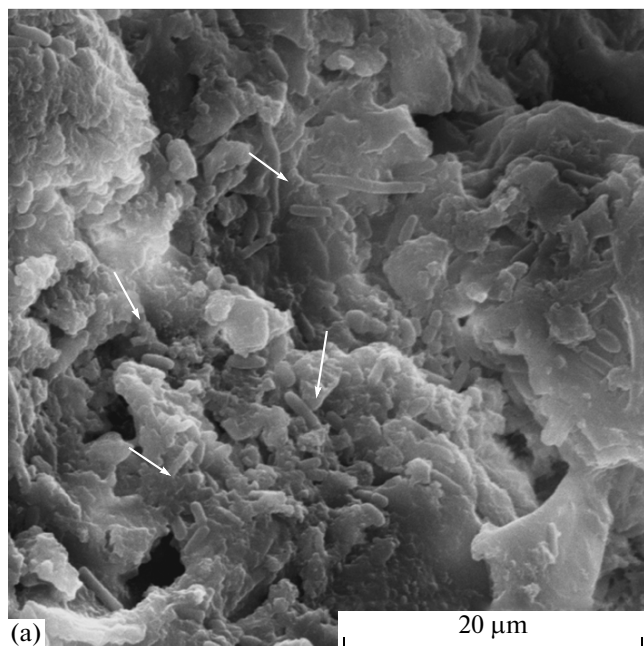
Из телят экспериментального хозяйства ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии “Кленово-Чегодаево”, отд. “Дубровицы”, в возрасте 25–30 дней методом аналогов были составлены 2 группы по 10 особей: 1 – контрольная и 2 – опытная. Животные 1 контрольной группы получали комбикорм без добавок. В состав комбикорма для 2 опытной группы дополнительно ввели 0.1% высушенной биомассы *B. subtilis* В-8130 в виде биопленки на фитоносителе. Опытное кормление проводили в течение 105 дней. При этом осуществляли ежедневный учет задаваемых кормов и их остатков для оценки потребления кормов. Для контроля за живой массой животных проводили

их индивидуальное взвешивание при постановке и снятии с опыта. На основании полученных данных рассчитывали общие и среднесуточные приросты. По окончании опыта анализировали показатели процесса пищеварения [10]. Для характеристики рубцового пищеварения у животных зондом отбирали пробы содержимого рубца через 3 ч после кормления. В полученных пробах определяли кислотность с помощью рН-метра Аквилон-410. Затем рубцовое содержимое фильтровали через 4 слоя стерильной марли, и в жидкой части определяли: (1) общее количество летучих жирных кислот (ЛЖК) – методом паровой дистилляции в аппарате Маркгама; (2) аммиачный азот – микродиффузным методом по Конвею; (3) количество биомассы простейших и бактерий – методом дифференцированного центрифугирования на центрифуге Beckman (Германия) model J2-21 Centrifuge [11] с последующим получением абсолютно сухой биомассы.

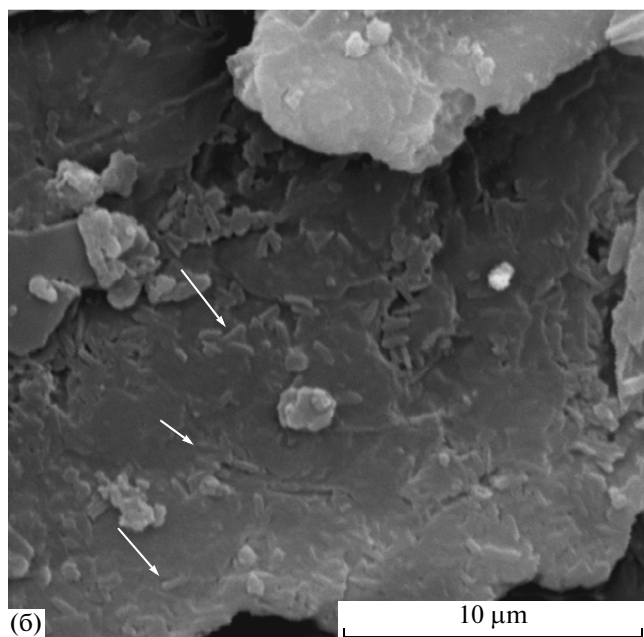
Полученные в опыте материалы обрабатывали биометрически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Видовой состав микробного сообщества рубцовой жидкости 6 бычков (по 3 животных из контрольной и опытной групп) в возрасте 4.5 мес. исследовали методом T-RFLP-анализа. ДНК из содержимого рубца выделяли экстракцией фенолом/хлороформом и очисткой раствором 2% СТАВ. ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК бактерий проводили с использованием праймеров: 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) – с меткой на 5'-конце (флуорофор D4 – WellRed) и 1492R (TACGGHTACCTTGTACGACTT), которые позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК с позициями от 63 до 1492 (нумерация указана для гена 16S рРНК *Escherichia coli*).

T-RFLP-анализ. Флуоресцентно меченные ампликоны гена 16S рРНК очищали с помощью раствора 3 М гуанидин-изотиоционата по стандартной методике [12]. Концентрацию очищенных фрагментов гена 16S рРНК определяли с помощью флюориметра Qubit 2.0 (“Invitrogen”, Карлсруэ, ФРГ) согласно рекомендации изготовителя. Рестриктицию 30–50 нг ампликонов 16S рРНК проводили рестриктазами *HaeIII*, *HhaI* и *MspI*, следуя рекомендации изготовителя (“Fermentas”, Литва), в течение 2 ч при 37°C. Продукты рестрикции осаждали этанолом, затем смешивали с добавлением 0.2 мкл маркера молекулярного веса Size Standart-600 (“Beckman Coulter”, США) и 10 мкл формамида Sample Loading Solution (“Beckman Coulter”, США) и анализировали с помощью SEQ 8000 (“Beckman Coulter”, США) согласно рекомендациям производителя. Вычисление размеров пиков и их площади проводили в программе Fragment Analysis (“Beckman Coulter”, США), на основании чего выделяли подтипы



(a)



(б)

Электронные микрофотографии: а – сырой продукт твердофазной ферментации, клетки *B. subtilis* В-8130 (отмечены стрелками) в массе биопленки; б – сухой препарат, клетки (отмечены стрелками) в большинстве покрыты сверху пленкой.

(филотипы) с принятой в исследовании погрешностью в 1.5 нуклеотида и определяли их процентное содержание в микробном сообществе. Принадлежность бактерий к определенной филогенетической группе определяли с использованием программы Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Для объяснения причинно-следственной связи между факторными и результативными признаками рассчитывали коэффициенты корреляции Пирсона [13] между количеством микроорганизмов в рубце бычков и показателями рубцового пищеварения (рН, выделением аммиака, летучих жирных кислот, количеством бактерий и простейших), позволяющие установить прямые связи между переменными величинами по их абсолютным значениям. Для подсчета использовали формулу в сокращенном варианте [14]:

$$r_{XY} = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}}$$

где  $X$  – значения, принимаемые переменной количества бактерий;

$Y$  – значения, принимаемые переменной количества ЛЖК, либо аммиака, либо биомассы простейших и бактерий;

$\bar{X}$  – средняя по  $X$ ,

$\bar{Y}$  – средняя по  $Y$ .

Коэффициенты корреляции считали высокими при абсолютных значениях  $r \geq 0.5$ . Показатели корреляции для отдельных филотипов анализировали в тех случаях, когда содержание рассматриваемого микроорганизма в общем микробном сообществе превышало 0.05%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе твердофазного культивирования штаммом *B. subtilis* В-8130 была образована биопленка на поверхности фитоносителя (рисунок, а), что подтвердило литературные сведения о способности вегетативных клеток *B. subtilis* образовывать биопленку [15]. Споры не выявлялись ни в сырой массе, ни в сухом продукте ферментации, в котором масса бацилл на твердой поверхности после высушивания оказалась покрытой сверху пленкой, что обеспечивало дополнительное закрепление бактерий на носителе и их защиту (рисунок, б). Численность *B. subtilis* В-8130 составила  $48 \times 10^8 \pm 10\%$  КОЕ/г сухой массы. Полученную массу ввели в комбикорм в количестве 0.1%. Обогащенный бациллами комбикорм использовали в рационе телят опытной группы, тогда как контрольные животные получали комбикорм без добавки. По окончании периода экспериментального кормления в рубцовой жидкости анализировали состав микробного сообщества. Микробиота рубца представлена различными группами: бактериями рубцовой жидкости, микроорганизмами, адгезированными на кормовых субстратах, и адгезированными на слизистой оболочке рубца [16, 17]. В настоящем исследовании внимание было обращено на популяцию бактерий химуса рубца, так как существует прямая за-

Таблица 1. Состав бактериального сообщества в рубце бычков по данным T-RFLP анализа, %

Таксономический ранг микроорганизмов	Группа животных	
	1 контрольная	2 опытная
Филум <i>Bacteroidetes</i>	11.15 ± 2.88	8.99 ± 1.2
Некультивируемые <i>Bacteroidetes</i>	0.54 ± 0.24	1.22 ± 0.58
Сем. <i>Bacteroidaceae</i>	1.48 ± 0.99	0.87 ± 0.17
Сем. <i>Flavobacteriaceae</i>	5.74 ± 2.41	4.24 ± 0.54
Сем. <i>Flexibacteraceae</i>	2.98 ± 0.73	2.53 ± 0.42
Сем. <i>Prevotellaceae</i>	0.42 ± 0.56	0.14 ± 0.1
Филум <i>Proteobacteria</i>	4.33 ± 1.29	6.78 ± 2.12
Сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	1.93 ± 0.86	2.63 ± 0.14
Сем. <i>Camphylobacteriaceae</i>	0.28 ± 0.37	н.п.д.о.
Сем. <i>Pseudomonadaceae</i>	1.52 ± 0.45	2.99 ± 1.72
Сем. <i>Burkholderiaceae</i>	0.63 ± 0.41	1.17 ± 0.05
Филум <i>Firmicutes</i>	55.11 ± 1.97	59.61 ± 2.24
Класс <i>Clostridia</i>	53.10 ± 2.06	55.72 ± 3.44
Сем. <i>Thermoanaerobacteriaceae</i>	1.00 ± 0.06	10.79 ± 3.28***
Сем. <i>Peptostreptococcaceae</i>	0.06 ± 0.08	0.77 ± 0.05***
Сем. <i>Clostridiaceae</i>	9.99 ± 1.35	7.15 ± 2.02
Сем. <i>Lachnospiraceae</i>	25.93 ± 1.41	21.27 ± 5.44
Сем. <i>Eubacteriaceae</i>	5.79 ± 1.7	7.83 ± 2.2
Сем. <i>Ruminococcaceae</i>	4.83 ± 0.74	2.89 ± 0.26*
Сем. <i>Veillonellaceae</i>	5.54 ± 0.62	5.05 ± 0.34
Класс <i>Bacilli</i>	1.7 ± 0.33	3.48 ± 0.97
Сем. <i>Bacillaceae</i>	1.46 ± 0.41	2.8 ± 0.3**
Сем. <i>Alicyclobacillaceae</i>	0.05 ± 0.02	0.45 ± 0.52**
Сем. <i>Paenibacillaceae</i>	0.2 ± 0.1	0.24 ± 0.17
Пор. <i>Lactobacillales</i>	0.32 ± 0.15	0.42 ± 0.21
Сем. <i>Lactobacillaceae</i>	0.32 ± 0.15	0.42 ± 0.21
Филум <i>Actinobacteria</i>	9.27 ± 1.95	8.08 ± 0.72
Сем. <i>Bifidobacteriaceae</i>	1.37 ± 0.29	0.4 ± 0.14*
Филум <i>Fusobacteria</i>	1.53 ± 0.24	0.81 ± 0.25*
Некультивируемые бактерии	16.74 ± 1.77	15.21 ± 0.49

Н.п.д.о. — ниже предела достоверного обнаружения.

Достоверно при: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.1$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

висимость между численностью бактерий и инфузорий в рубцовом содержимом и привесом жвачных — чем больше количество микроорганизмов, тем выше привес животных [18].

Полученные результаты выявили различия в микробиологических характеристиках рубцовой жидкости в контрольной и опытной группах молодых животных.

В составе микробиоценоза содержимого рубца бычков контрольной группы в возрасте 4.5 мес., когда молодые животные полностью перешли с молочного на растительный рацион [19], и, следова-

тельно, у них в основном сформировался состав микробного сообщества, по данным T-RFLP-анализа (табл. 1) доминировали представители филума *Firmicutes* (55.11 ± 1.97%), главным образом, класса *Clostridia* (53.10 ± 2.06%), в котором основную долю составляли бактерии сем. *Lachnospiraceae* (25.93 ± 1.41%) и сем. *Clostridiaceae* (9.90 ± 1.35%). Примерно в равных долях присутствовали члены филума *Bacteroidetes* (11.15 ± 2.88%), филума *Actinobacteria* (9.27 ± 1.95%). Доля бацилл сем. *Bacillaceae* была менее двух процентов (1.46 ± 0.41%). Практически столько же, сколько и бацилл, ока-

**Таблица 2.** Среднесуточный прирост массы тела 4.5 мес. бычков ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ ) и показатели процессов рубцового пищеварения этих животных

Группа животных	Среднесуточный прирост, г	рН	Аммиак, мг%	ЛЖК, ммоль/100 мл содержимого рубца	Абсолютно сухая биомасса, г/100 мл содержимого рубца	
					Простейшие	Бактерии
1 контрольная	753.9 ± 25.25	6.8 ± 0.02	18.12 ± 0.02	11.24 ± 0.03	1.34 ± 0.04	0.40 ± 0.02
2 опытная	852.9 ± 37.65*	6.9 ± 0.04	20.86 ± 0.04	12.44 ± 0.04	1.87 ± 0.05	0.52 ± 0.02

Достоверно при: \*  $p \leq 0.05$ .

залось представителей бактерий семейств *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, филума *Fusobacteria*. Количественное содержание бактерий остальных идентифицированных групп было менее 1%, в том числе, лактобацилл сем. *Lactobacillaceae* –  $0.32 \pm 0.15\%$ . Значительная часть микроорганизмов в рубце животных являлись некультивируемыми. Доля неклассифицируемых форм в совокупности с некультивируемыми бактероидами составила  $17.28 \pm 2.01\%$ .

В проведенном эксперименте выявленный состав микробного сообщества в рубцовой жидкости бычков характеризовал процессы пищеварения в этом отделе ЖКТ, которые соответствовали физиологическому состоянию молодых животных на растительной диете. Расщепление клетчатки и крахмала кормов связано с массовым развитием бактерий сем. *Lachnospiraceae*, филума *Bacteroidetes*, сем. *Ruminococcaceae*, сем. *Thermoanaerobacteriaceae*, обладающих целлюлолитической и амилолитической активностями. Ферментация сложных и простых углеводов обеспечена также совокупной жизнедеятельностью представителей семейств *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Veillonellaceae* и других присутствующих в рубце бактерий [20]. Относительно низкую численность лактобацилл и бифидобактерий можно объяснить возрастными особенностями бычков, период онтогенеза которых в момент взятия проб содержимого рубца был связан с приоритетным развитием микроорганизмов, участвующих в расщеплении клетчатки и крахмала растительных компонентов кормов.

Защищенные пленкой клетки *B. subtilis* В-8130, поступившие с кормами в организм бычков, вызвали в рубцовой жидкости увеличение доли бактерий сем. *Bacillaceae* с  $1.46 \pm 0.41\%$  до  $2.80 \pm 0.30\%$ , что, вероятно, связано с размножением введенных бацилл, и повлияли на изменения в общей численности и соотношении отдельных представителей рубцового микробного сообщества. Практически на порядок возросла численность *Thermoanaerobacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Alicyclobacillaceae*. В среднем в 2 раза увеличилось количество некультивируемых *Bacteroidetes*, а также *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*. За счет уве-

личения количества отмеченных форм произошло перераспределение соотношения членов микробного сообщества, в том числе, некоторое снижение доли доминантов и достоверное снижение численности *Ruminococcaceae*, и *Bifidobacteriaceae*, что, однако, не отразилось негативно на показателях роста и развития опытных животных и их пищеварения (табл. 2). При сравнении с показателями рубцового пищеварения контрольных бычков выявлено, что клетки *B. subtilis* В-8130 вызвали повышение в рубцовой жидкости опытных животных в 1.3 раза общего количества рубцовых бактерий и простейших, а также увеличение синтеза летучих жирных кислот и выделения аммиака – показателей, характеризующих эффективность пищеварения. Полученные данные потребовали дополнительных исследований для понимания биологических основ обнаруженного явления.

По результатам T-RFLP-анализа были рассчитаны коэффициенты корреляции между содержанием отдельных микроорганизмов и групп в микробном сообществе и основными показателями пищеварения в рубце. Ранее подобный метод был успешно применен к изучению взаимосвязей метаболизма птицы с содержанием микроорганизмов в их желудочно-кишечном тракте [21].

В содержимом рубца молодых бычков среди представителей доминирующего в сообществе сем. *Lachnospiraceae* было выявлено два фило типа (262 п.н. и 279 п.н.), имеющих высокую положительную связь, и один (277 п.н.) – отрицательную. Для фило типа 262 п.н. коэффициенты корреляции с образованием ЛЖК, аммиака, общим количеством бактерий и простейших составили  $r = 0.66$  по каждому; у фило типа 279 п.н. для всех аналогичных коэффициентов  $r \geq 0.68$ . Для фило типа 277 п.н. показатели находились в интервале от  $r = -0.66$  до  $r = -0.69$ . Следует отметить, что преобладающий в этой группе фило тип 264 п.н. (*Butyrivibrio fibrisolvens*), численность которого в общем микробном сообществе составила 14.0% у контрольных и 11.9% у опытных животных, отличался низкими значениями корреляционных связей с рубцовым пищеварением. Слабо положительные взаимосвязи выявлены с рН ( $r = 0.1$ ), количеством бакте-

рий в рубце ( $r = 0.03$ ) и отрицательные с остальными показателями пищеварения, для которых значения  $r$  не превышали  $r = -0.17$ . Полученные результаты указали на гетерогенность сем. *Lachnospiraceae*, включающего представителей, выполняющих противоположную роль в рубцовом пищеварении или функционально не связанных с исследуемыми показателями.

Для сем. *Clostridiaceae*, так же, как и для сем. *Lachnospiraceae*, показано присутствие представителей с различной направленностью корреляционных зависимостей. Так, филоотипы 182 п.н., 184 п.н., 186 п.н., 188 п.н., имели положительные связи с показателями пищеварения в рубце (значения коэффициентов корреляции составляли от  $r = 0.59$  до  $r = 0.8$ ), а филоотип 492 п.н. — отрицательную, коэффициенты корреляции для этого микроорганизма имели значения от  $r = -0.63$  до  $r = -0.68$ . Различное влияние микроорганизмов данной филогенетической группы на экосистему микробного сообщества рубца можно объяснить тем, что сем. *Clostridiaceae* включает виды, обладающие широким спектром биохимической активности, в числе которых присутствуют как полезные для симбионтного пищеварения, так, очевидно, и негативные.

Среди бактерий сем. *Eubacteriaceae* были выявлены филоотипы, имеющие только высокую положительную связь с показателями пищеварения в рубце: так, для филоотипа 199 п.н. *Eubacterium ruminantium* значения коэффициентов корреляции  $r$  составляли от  $r = 0.74$  до  $r = 0.79$ .

В составе сем. *Ruminococcaceae* присутствовал филоотип 250 п.н., относящийся к роду *Faecalibacterium*, который имел отрицательную связь со всеми показателями пищеварения ( $r = -0.65$ ). Доля данного микроорганизма составляла в рубцовой жидкости бычков контрольной группы  $2.32 \pm 0.82\%$ , а у животных опытной группы этот показатель оказался уменьшен до  $0.70 \pm 0.18\%$ . При стимулирующем воздействии на рост и развитие хозяина интенсификации процесса пищеварения в микробной экосистеме должно быть ограничено развитие форм, тормозящих данный процесс, что и продемонстрировали результаты исследования. Полученные отрицательные показатели связи филоотипа *Faecalibacterium* sp. с пищеварением позволили предположить, что эти микроорганизмы принимали участие в синтезе нежелательных в рубцовом пищеварении компонентов. Активный препарат с *Bacillus subtilis* сдвинул равновесие системы в сторону ингибирования этого представителя сем. *Ruminococcaceae*, а поскольку доля последнего у контрольных животных составляла 48% от всех членов этого семейства, в микробном сообществе хмуса рубца опытных бычков произошло отмеченное выше снижение общего количества руминококков (табл. 1). Таким образом,

уменьшение численности сем. *Ruminococcaceae* при введении в корма бацилл связано с перераспределением долевого присутствия членов семейства и снижением содержания той его части, которая играла отрицательную роль в процессах пищеварения.

При анализе в рубцовой жидкости сем. *Veillonellaceae* установлено, что представитель семейства, филоотип 259 п.н. *Megamonas hypermegale*, был положительно связан с количеством летучих жирных кислот и аммиака в рубце животных,  $r = 0.75$ . Доля данных бактерий в содержимом рубца бычков опытной группы возросла в три раза по сравнению с контрольными животными и составила  $1.82 \pm 0.89\%$  (в контроле данный показатель был равен  $0.60 \pm 0.12\%$ ). Известно [22], что увеличение в рубце жвачных содержания микроорганизмов данной филогенетической группы связано с активизацией ферментации легкоперевариваемых углеводов, вызванной стимуляцией развития амилитических микроорганизмов. Последние при сбраживании крахмала продуцируют большие количества молочной и янтарной кислот, а лактатферментирующие бактерии, к которым относятся представители сем. *Veillonellaceae*, преобразуют эти кислоты в ЛЖК с преимущественным образованием пропионовой кислоты. Таким образом, взаимодействие этих бактерий оказывает влияние на направленность углеводного обмена в организме хозяина. Кроме того, установлена достоверная отрицательная зависимость между показателями пищеварения в рубце и содержанием в микробном сообществе филоотипа 246 п.н., относящегося к роду *Fusobacterium* sp. филума *Fusobacteria*, значения  $r$  составляли:  $r = -0.79$  для ЛЖК и общего количества простейших и бактерий, и  $r = -0.80$  для аммиака. Отрицательная взаимосвязь *Fusobacterium* sp. с пищеварением, по видимому, объясняется тем, что данный микроорганизм вступает в конкурентные отношения с симбионтами — основными участниками рубцового пищеварения, поскольку при снижении pH способен размножаться, используя лактат, образующийся в процессе ферментации крахмала. При введении в рацион животных вегетативных клеток *B. subtilis* происходит изменение микробного состава, увеличение pH и повышение синтеза ЛЖК с преимущественным образованием пропионовой кислоты бактериями сем. *Veillonellaceae*, что препятствует размножению *Fusobacterium* sp.

Среди некультивируемых видов в рубцовой жидкости также были выявлены филоотипы, как отрицательно связанные с показателями пищеварения хозяина (например, для филоотипа 430 п.н. значения  $r$  составили от  $r = -0.82$  до  $r = -0.89$ ), так и положительно (например, для филоотипа 431 п.н. коэффициенты корреляции колебались от  $r = 0.65$  до  $r = 0.74$ ). Следовательно, роль некультивируемых форм микробиоценоза рубцовой жидкости в

**Таблица 3.** Отдельные филоциты микробного сообщества рубцовой жидкости, имеющие высокие значения коэффициентов корреляции с показателями рубцового пищеварения (по данным T-RFLP анализа)

Длина фрагмента, п.н.	Микроорганизм	Характер корреляционной связи	Доля филоцита, %	
			1 контрольная группа	2 опытная группа
460	бактерия сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	+	0.63 ± 0.23	1.93 ± 0.58
182, 184, 186, 188	<i>Clostridium</i> sp.	+	0.36 ± 0.05	2.22 ± 0.32
492	<i>Clostridium</i> sp.	–	0.77 ± 0.24	0.21 ± 0.07
199	<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	0.51 ± 0.28	1.91 ± 0.66
262	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	2.61 ± 0.38	3.95 ± 1.27
277	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	–	6.29 ± 3.75	2.45 ± 0.36
279	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	+	1.01 ± 0.74	2.06 ± 0.63
250	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	–	2.32 ± 0.82	0.7 ± 0.18
259	<i>Megamonas hypermegale</i>	+	0.60 ± 0.12	1.82 ± 0.89
265	<i>Selenomonas</i> sp.	–	1.17 ± 1.01	0.63 ± 0.15
242	<i>Amycolatopsis</i> sp.	–	1.23 ± 0.35	0.06 ± 0.01
243	<i>Arthrobacter</i> sp.	–	1.02 ± 0.89	0.28 ± 0.14
246	<i>Fusobacterium</i> sp.	–	1.50 ± 0.35	0.60 ± 0.45
430	Некультивируемая бактерия	–	1.18 ± 0.50	0.08 ± 0.04
431	Некультивируемая бактерия	–	1.38 ± 0.66	0.53 ± 0.2
462	Некультивируемая бактерия	+	0.28 ± 0.08	1.12 ± 0.31
Суммарная доля положительно связанных филоцитов			6.00 ± 1.76	15.01 ± 4.66
Суммарная доля отрицательно связанных филоцитов			16.86 ± 8.57	5.54 ± 1.6

Достоверно при:  $p \leq 0.05$ .

процессе пищеварения также неоднозначна, как и других членов микробного сообщества.

Сем. *Bacillaceae* характеризовалось положительной связью с пищеварением бычков: бациллы имели высокие положительные коэффициенты корреляции с количеством аммиака ( $r = 0.83$ ), а также положительно коррелировали с количеством простейших и бактерий в содержимом рубца ( $r = 0.57$ ). Перестройку рубцовой микробной экосистемы под воздействием вегетативных клеток *B. subtilis* В-8130 можно объяснить усилением этого, в целом положительного для хозяина, сем. *Bacillaceae*, что вызвало цепную реакцию направленного сдвига в микробном сообществе рубцовой жидкости в сторону преимущественного развития тех его членов, которые также положительно влияли на процесс пищеварения животного организма. Предположение подтверждается значительной стимуляцией развития филоцитов, в том числе, среди некультивируемых форм, положительно связанных с пищеварением и ингибированием филоцитов, имеющих отрицательную связь (табл. 3).

Возникает вопрос о функциональной роли членов микробного сообщества рубца, отрицательно связанных с показателями рубцового пищеварения. Очевидно, их значение в симбиозе

иное, связанное, например, с обеспечением защиты от патогенов, участием в выработке иммунитета [23] или деструкцией токсичных низкомолекулярных веществ [24].

Из приведенных данных в табл. 3 следует, что 75–80% от доли всех микроорганизмов рубцовой жидкости составляли формы, слабо связанные или несвязанные с показателями рН, количеством аммиака, ЛЖК, численностью простейших. Поскольку эти микроорганизмы потребляют питательные вещества для своего развития, характер взаимоотношений их с хозяином может являться комменсализмом. Не исключается использование биомассы бактерий для поддержания гомеотермии [24], что согласуется с повышенной температурой в рубце жвачных, которая составляет 38–42°C, а также их потребление в качестве источника микробного белка, что может не предполагать участия этих бактерий в пищеварении.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что введенные в состав кормов вегетативные клетки пробиотика *B. subtilis* в защищенной биопленкой форме обладают способностью оказывать воздействие на жвачных путем стимуляции рубцового пищеварения. Непосредственно в процессе пищеварения принимают участие не

все микроорганизмы, присутствующие в содержимом рубца, и даже не доминирующие, а минорные формы, суммарная доля которых в микробном сообществе не превышала 6%. Именно на них и оказал влияние пробиотик, вызвав направленную перестройку микробной экосистемы рубцовой жидкости в сторону суммарного увеличения в три раза содержания бактерий, положительно влияющих на пищеварение, рост и развитие хозяина.

Авторы выражают благодарность сотруднику кабинета электронной микроскопии ИПЭЭ РАН Суровенковой Н.А. за помощь в работе.

Работа сделана при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, ГК № 16.М04.11.0012.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stackebrandt E., Goebel B.M.* Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. V. 44. P. 846–849.
2. *Schütte U.M., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C., Williams C.J., Pierson J.D., Forney L.J.* Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 80. № 3. P. 365–380.
3. *Hartman N., Widmar F.* Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008. V. 63. № 2. P. 249–260.
4. *Dunne W.M., Jr.* Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? // *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. V. 15. № 2. P. 155–166.
5. *Keller L., Surette L.G.* Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective // *Nature Revs. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 249–258.
6. *Rosak D.B., Colwell R.R.* Survival strategies of bacteria in the natural environment // *Microbiol. Revs.* 1987. V. 51. P. 365–379.
7. *Ильина Л.А., Балакирева А.Ф., Йылдырым Е.А., Лаптев Г.Ю.* Исследование бактериального сообщества рубца коров с помощью T-RFLP-анализа // *Молочное и мясное скотоводство.* 2011. № 2. С. 24–27.
8. *Ушакова Н.А., Павлов Д.С., Чернуха Б.А., Кошелев Ю.А., Козлова А.А., Нифатов А.В.* Способ получения биологически активной кормовой добавки. Патент РФ № 2346463, приоритет от 20.03.2007. Опубликовано 20.02.2009. Бюл. № 5.
9. *Donaldson D.M., Roberts R.R., Larsen H.S., Tew J.G.* Interrelationship between serum beta-lysin, lysozyme, and the antibody-complement system in killing *Escherichia coli* // *Infect. Immun.* 1974. V. 10. № 3. P. 657–666.
10. *Курилов Н.В., Севастьянова Н.А., Кориунов В.Н., Фирсов В.И., Мыслик Н.Д., Подшибякин А.Е., Харитонов Л.В., Щеголев С.Я.* Изучение пищеварения у жвачных (Методические указания). Боровск: ВНИИФБиП с.-х. жив., 1975. 148 с.
11. *Тараканов Б.В., Николочева Т.А., Шавырина Т.А.* Модификация методики выделения микробных фракций из содержимого рубца и химуса 12-типерстной кишки // *Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных.* 1982. Вып. 2. № 66. С. 72–75.
12. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
13. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
14. *Гмурман В.Е.* Теория вероятностей и математическая статистика: Учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа, 2004. 479 с.
15. *Kearns D.B., Chu F., Rudner R., Losick R.* Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 86. № 3. P. 344–364.
16. *Mc Cowan R.P., Cheng K.-J., Costerton J.W.* Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. V. 1. P. 233–241.
17. *Dehority B.A., Grubb J.* Bacterial population adherent to the epithelium of the roof of the dorsal rumen in sheep // *Environ. Microbiol.* 1981. V. 41. № 6. P. 1424–1427.
18. *Cheng K.-J., Costerton J.W.* Adherent rumen bacteria – their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells // *Digestive physiology and metabolism in ruminants* / Eds. Y. Ruckebush, P. Thivend. AVI Publishing Co. Inc. Westport. Conn., 1980. P. 227–250.
19. *Курилов Н.В., Краткова А.П.* Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М.: Колос, 1971. 432 с.
20. *Современная микробиология: Прокариоты* / Под ред. Ленгелер Й., Древис Г., Шлегель У. М.: Мир, 2005. Т. 1–2. 1152 с.
21. *Torok V.A., Ophel-Keller K., Loo M., Hughes R.J.* Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 783–791.
22. *Тараканов Б.В., Николочева Т.А.* Целлюлозолитическая микрофлора и метаболические функции в рубце молодняка крупного рогатого скота при раннем включении в рацион растительных кормов // *Сельскохозяйственная биология.* 1986. № 4. С. 89–94.
23. *Chung H., Kasper D.L.* Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis // *Curr. Opin. Immunol.* 2010. V. 22. № 4. P. 455–460.
24. *Бабин В.Н., Домарадский И.В., Дубинин А.В., Кондракова О.А.* Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры // *Российский хим. журн.* 1994. № 6. С. 66–78.