

# ТЕХНОЛОГИИ ЗАГОТОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВ

УДК 636.085.52.085.7

## ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА БАКТЕРИАЛЬНОЕ СООБЩЕСТВО ПЛЮЩЁНОГО ЗЕРНА

Л. А. ИЛЬИНА  
К. В. НАГОРНОВА  
Е. А. ИЫЛДЫРЫМ  
В. А. ДУМОВА  
И. Н. НИКОНОВ  
Н. И. НОВИКОВА  
Г. Ю. ЛАПТЕВ  
ООО «БИОТРОФ»  
E-mail: mail@biotrof.ru

*В работе изучен состав микрофлоры плющёного зерна, законсервированного с использованием биопрепарата на основе бактерий *Bacillus subtilis*, с использованием T-RFLP-анализа и экологического подхода на основе применения индексов биоразнообразия. Выяснено, что применение биопрепарата способствует стабилизации микробиоценоза корма с преобладанием желательных микроорганизмов.*

**Ключевые слова:** плющение зерна, микрофлора, молекулярно-генетические методы.

Потребность животноводства в зерновых кормах из года в год увеличивается, и в этом контексте особое значение приобретает рациональное использование зерна, в первую очередь его правильное хранение. Повышенная влажность сырья при закладке на хранение создаёт оптимальные условия для развития плесневых грибов и гнилостных бактерий, тогда как основа правильного консервирования — преобладание молочнокислого брожения и угнетение нежелательной микрофлоры.

Управление технологическим процессом консервирования предполагает знание особенностей микрофлоры, развивающейся в зерновой массе при хранении, последовательности изменений в её составе, факторов, которыми возможно регулировать её жизнедеятельность. До сих пор для этого специалисты использовали классические микробиологические методы — культивирование микроорганизмов на искусственных питательных средах, что позволяло выявить не более 1–10 % от общего количества бактерий. Современные методы исследований показали, что для оценки микробного разнообразия необходим качественно новый подход.

Развитие метагеномных методов сделало возможным изучение разнообразия микроорганизмов без стадии культивирования. Большинство таких методов основано на необходимости выделения в чистые культуры и дальнейшего клонирования в вектор ДНК каждого из многочисленных представителей микробного сообщества. Затем следует стадия анализа полученных библиотек клонов в базах данных [1–3]. Однако, несмотря на широкий спектр возможностей, эти методы достаточно трудоёмки и дорогостоящи. Кроме того, часто перед исследователем стоит задача не просто изучить структуру микробного сообщества, но и

проследить за её изменением в результате какого-либо воздействия.

Наиболее перспективным на сегодняшний день является молекулярно-генетический метод — T-RFLP-анализ (terminal restriction fragment length polymorphism). Он основан на анализе вариабельности консервативных участков генома микроорганизмов. Суть метода заключается в выделении ДНК всех находящихся в плющёном зерне бактерий, увеличении её количества с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), ферментативном (рестриктазном) расщеплении на фрагменты и разделении их на автоматическом секвенаторе. Таксономическая принадлежность бактерий определяется в соответствии с длинами терминальных фрагментов анализируемого гена с помощью программы Fragment Sorter.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния биопрепарата на основе бактерий *Bacillus subtilis* на протекание микробиологических процессов при консервировании плющёного зерна с использованием T-RFLP-анализа. Как известно, бактерии *Bacillus subtilis* продуцируют широкий спектр метаболитов, обладающих мощными антимикробными и антифунгальными свойствами, в том числе по отношению к возбудителям маслянокислого брожения и продуцентам токсинов.

**Методика исследований.** В работе были использованы образцы плющёного зерна, отобранные на 40-сутки после закладки зерна на хранение в лабораторном опыте. Влажность пробы составляла 28 %. Опытный вариант был законсервирован с биопрепаратом на основе бактерий *Bacillus subtilis*. Биопрепарат разработан в компании «БИОТРОФ». Анализ бактериального сообщества проводили с помощью оригинальной методики T-RFLP-анализа. Микробиологические процессы в плющёном зерне оценивали с помощью эко-

логического подхода на основе применения индексов биоразнообразия [4].

Аmplифицировали универсальные фрагменты генов микроорганизмов с помощью флуоресцентных праймеров, обрабатывали полученные ДНК эндонуклеазами рестрикции и разделяли фрагменты генов микроорганизмов на секвенаторе. В результате получался «снимок» — T-RFLP-грамма с пиками, каждый из которых указывал на отдельный микроорганизм, а площадь пика — на долю этого микроорганизма в микробном сообществе.

Аmplификацию бактериальных генов проводили с помощью следующих праймеров:

63F5'-AGGCCTAACACATGCAAGTC-3';

1087R5'-CTCGTTGCGGGACTTACCCC-3'.

Праймер 63F имел с 5'-конца флуоресцентную метку Су5 (цианин-5 дезоксицитидинтрифосфата).

Электрофорез, амплификацию, выделение ДНК из геля и рестрикцию эндонуклеазами (HaeIII, HhaI и MspI) проводили по стандартным методикам [5]. Далее ДНК осаждали этанолом, растворяли в SLS (Beckman Coulter), добавляли маркер «Size Standart 600» (Beckman Coulter) и разделяли в секвенаторе CEQ8000 (Beckman Coulter). Вычисление размеров пиков и их площади проводили в программе Fragment Analysis (Beckman Coulter). Для определения таксономической принадлежности пиков данные T-RFLP для

трёх эндонуклеаз (HaeIII, HhaI и MspI) обрабатывали с помощью программы Fragment Sorter.

**Результаты исследований.** Результаты исследований представлены в таблице 1. Доминирующая микрофлора в контрольной пробе (плющеное зерно без добавок) на 40-е сутки была представлена некультивируемыми молочнокислыми бактериями, бациллами. Значительным было содержание актиномицетов, способных негативно влиять на процесс хранения и качество плющеного зерна (в особенности род *Corynebacterium*).

В опытном варианте с добавлением биопрепарата на основе бактерий *Bacillus subtilis* полностью отсутствовали энтеробактерии, актиномицеты, клостридии. При этом молочнокислые бактерии содержались в значительном количестве (37,7%), что свидетельствует о нормальном процессе консервирования сырья.

Индекс Шеннона характеризует видовое разнообразие сообщества. Возрастание индекса Шеннона свидетельствует о возрастании неопределённости и однородности структуры системы. Мера доминирования (индекс Симпсона) показывает, какую долю в видовом составе биоценоза занимают обычные, «фоновые» виды. Индекс выравненности Пиелу показывает относительное распределение особей среди видов. Результаты представлены в таблице 2.

## 1. Содержание различных групп микроорганизмов в плющеном зерне

№	Группы микроорганизмов	Родовое разнообразие микроорганизмов	Суммарная доля филотипов, входящих в сходные группы микроорганизмов, %	
			Контроль без добавок (40 сутки)	Биопрепарат на основе <i>Bacillus subtilis</i> (40-е сутки)
1	Молочнокислые бактерии	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Aerococcus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i>	28,5	37,7
2	Бациллы	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>Alicyclobacillus sp.</i>	16,9	2,7
3	Стафилококки	<i>Staphylococcus sp.</i>	2,4	-
4	Энтеробактерии	<i>Enterobacter sp.</i> , <i>Erwinia sp.</i> , <i>Proteus sp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	1,8	-
5	Клостридии	<i>Clostridium sp.</i> , <i>Desulfotomaculum sp.</i>	1,9	-
6	Псевдомонады	<i>Pseudomonas sp.</i>	2,7	2,4
7	Бактероиды	<i>Prevotella sp.</i> , <i>Bacteroides sp.</i>	3,6	10,0
8	Актиномицеты	<i>Amycolatopsis sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>	10,6	-
9	Буркхолдерии	<i>Burkholderia sp.</i>	0,90	0,40
10	Некультивируемые бактерии	<i>uncultured bacterium</i>	30,4	46,8
11	Селеномонады	<i>Selenomonas sp.</i>	0,30	-

## 2. Расчет экологических индексов

Показатель:	Контроль	Опыт (+ <i>Bacillus subtilis</i> )
Число видов	154	53
Индекс Шеннона	6,244	4,306
Индекс выровненности по Пиелу	0,862	0,752
Индекс доминирования по Симпсону	0,028	0,105

Видно видно, что индекс Шеннона в опытном варианте существенно меньше контрольного. Из общей экологии известно, что значения индекса Шеннона, превышающие (по данным разных исследователей) значения 4,5–5,0, свидетельствуют о накоплении энтропии в системе и её дезорганизации. Можно сделать заключение о том, что применение биопрепарата на основе бактерий *Bacillus subtilis* стабилизирует микробиоценоз плющёного зерна и оптимизирует микробиологический процесс, определяющий нормальное консервирование. Необходимо отметить, что в контроле выявлено 154 вида бактерий, в опытном варианте — 53, что подтверждает предположение о нестабильном микробиоценозе в контрольном варианте. Другие экологические индексы подтверждают это предположение.

**Заключение.** Оценка микрофлоры плющёного зерна на основе T-RFLP-анализа позволяет максимально полно оценить структуру и состав бактериальных микробиоценозов плющёного зерна при консервировании. Использование T-RFLP-анализа делает возможным корректное использование экологического подхода на основе индексов биоразнообразия. Выяснено, что применение биопрепарата на основе бактерий *Bacillus subtilis* для консервирования плющёного зерна обеспечивает оптимизацию микробиологических процессов, влияющих на качество заготавливаемого корма.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» при поддержке государственного контракта № 14.512.11.0075 Министерства образования и науки Российской Федерации.

## Литература

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. — Vol.44 — P.846–847.
2. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* — 1995. — Vol.59 — P.143–169
3. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2004. — Vol.68 — P.669–85.
4. Одум Ю. Основы экологии // М.: «Мир», 1975. — 741 с.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование // М.: Мир, 1984. — 480 с.

### Effect of biological preparation on the basis of *Bacillus subtilis* on the bacterial population of rolled grain

L. A. Ilyina, K. V. Nagornova, E. A. Yildirim,  
V. A. Dumova, I. N. Nikonov, N. I. Novikova,  
G. Yu. Laptev

The study has been dedicated to assessing the microbial population of rolled grain preserved with a biological preparation based on *Bacillus subtilis* bacteria. T-RFLP analysis was applied together with an ecological approach based on the biodiversity indices. It is ascertained that using the biological preparation contributes to stabilizing the microbiota of the forage with the desirable microbial species prevailing.

**Keywords:** T-RFLP analysis, microbiosis, molecular genetic methods