

МОЖЕТ ЛИ СИЛОС СТАТЬ ПРИЧИНОЙ АЦИДОЗА?

Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Дубровин А.В., Филиппова В.А., Новикова Н.И., Тюрина Д.Г., Лаптев Г.Ю.

Метаболические нарушения у коров, прежде всего, ацидоз рубца, наносят фермам значительный экономический ущерб. Расходы складываются из недополученного молока, затрат на ветеринарные мероприятия, а также убытков от преждевременного выбытия животных из стада. Ведь такие заболевания, как некробактериоз рубца, патологии печени, снижение способности к воспроизводству, хромота напрямую связаны с ацидозом.

Несмотря на то, что изучение изменений микробных популяций при ацидозе рубца у коров началось 7 десятилетий назад, у производителей молока до сих пор не сформировалось единого мнения о причинах возникновения метаболических нарушений. В последнее время у специалистов ферм возникает озабоченность по поводу возможности влияния на возникновение ацидоза рубца кислот брожения в силосе. Итак, когда дело доходит до установления истинных причин ацидоза коров, что же действительно является фактом, а что вымыслом?

ПРИЧИНА В ПЕРЕГРУЗКЕ КОНЦЕНТРАТАМИ

Компания НПК «БИОТРОФ» имеет единственную в России молекулярно-генетическую лабораторию, которая детально анализирует микробиом рубца. Одна из наиболее сложных и дорогостоящих технологий — это NGS-секвенирование (next generation sequencing), которое позволяет выявить полный видовой состав всех 100% микробных сообществ рубца.

На основании изучения более 5 тысяч образцов рубцового содержимого с применением молекулярных методов доказано, что причины лактатного ацидоза исключительно микробиологические. Дело в том, что энергетический метаболизм жвачных уникален: энергия поступает, в основном, за счет микробного брожения в рубце. Одной из важнейших функций рубца является ферментация клетчатки кормов целлюлозолитическими микроорганизмами (рис. 1).

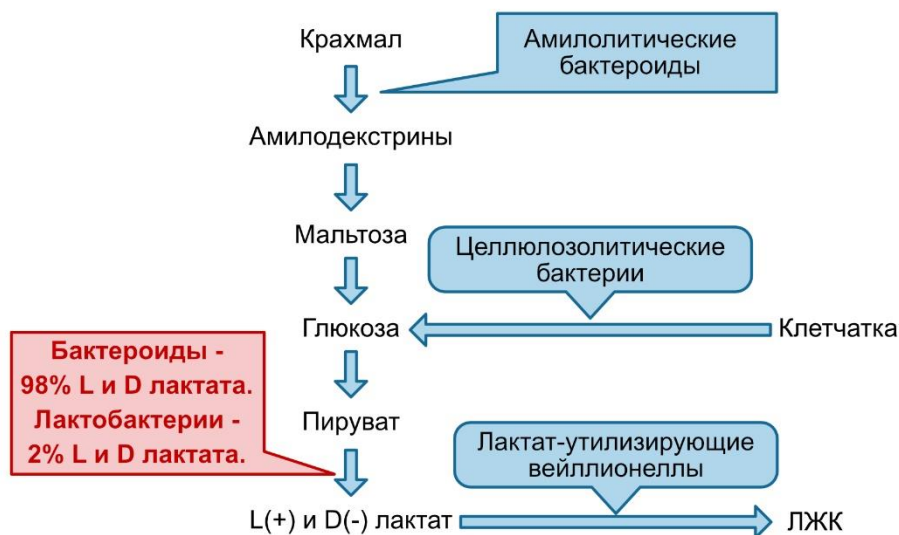


Рис. 1. Микробиологические процессы в рубце коров по данным молекулярно-генетических исследований (дизайн НПК «БИОТРОФ»)

Значительная доля микроорганизмов рубца представлена амилолитическими бактериодами, которые могут производить большое количество молочной кислоты из крахмала и глюкозы (рис. 1). В рубце клинически здоровых животных молочная кислота способна сбраживаться лактат-утилизирующими вейллионеллами до летучих жирных кислот (ЛЖК): пропионат, ацетат, бутират и т.д. Поэтому эти бактерии играют центральную роль в предотвращении накопления молочной кислоты в рубце.

В то же время, в последние годы в хозяйствах нашей страны, особенно, в Ленинградской области, существенно выросла молочная продуктивность коров. Однако этот скачок связан не с повышением качества кормов собственной заготовки, а с увеличением в рационе доли комбикормов.

Такое кормление резко не соответствует физиологическим потребностям животных. Именно перегрузка рубца доступными формами энергии: крахмалом и сахаром, - и вызывает ацидоз рубца (рис. 2). Это связано с тем, что ферментируемые углеводы в нефизиологических количествах провоцируют гиперпродукцию ЛЖК в рубце с одновременным снижением pH.

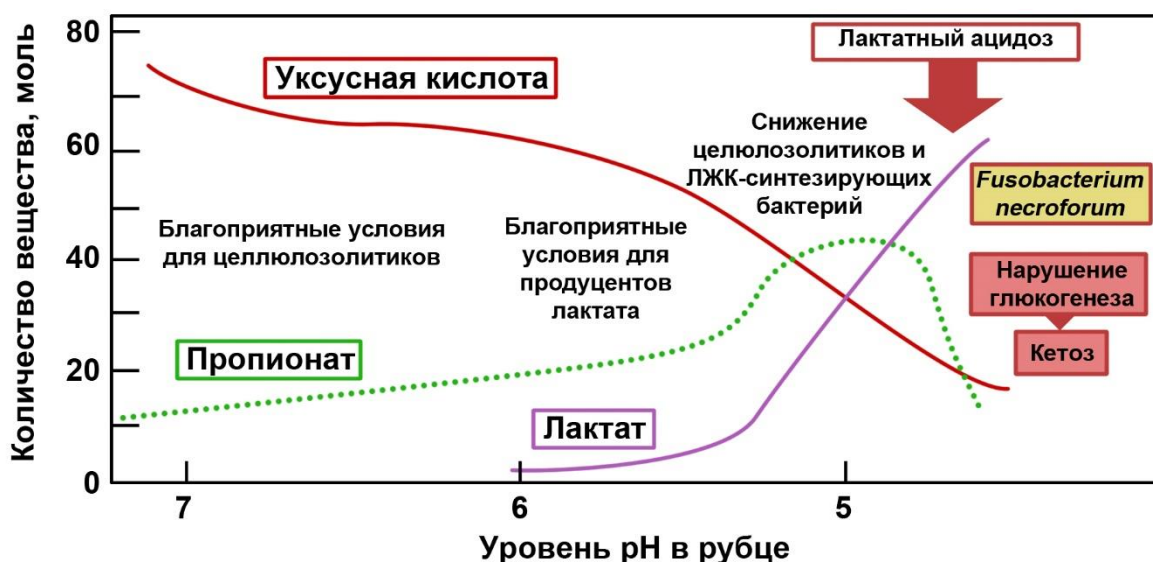


Рис. 2. Изменения микробного и метаболического профиля рубца коров на фоне высококонцентратного кормления (дизайн НПК «БИОТРОФ»)

Дальнейшие изменения, связанные с ацидозом, включают, прежде всего, сдвиги в популяциях бактерий, образующих мощную кислоту – лактат (рис. 1, 2). Увеличение производства лактата происходит, главным образом, из-за создания кислотоустойчивой популяции амилолитических бактериоидов, ферментирующих крахмал и сахара. Доля амилолитических бактериоидов в рубце может достигать 90-95% от общего количества бактерий у животных, страдающих ацидозом (рис. 3). Интересно, что на фоне ацидоза среди группы лактат-синтезирующих бактерий микроорганизмы рода *Lactobacillus*, быстрые темпы роста не проявляют (рис. 3). Их доля, как правило, колеблется в диапазоне 0,05-0,4%. Дело в том, что выживаемость бактерий в такой агрессивной среде как пищеварительная система – свойство, индивидуальное не только для каждого вида, но и штамма. Оно зависит от совокупности таких свойств, как способность к адгезии (прикреплению) к стенкам рубца, жизнеспособности, возможности образования биопленок и пр. Поэтому попытки применения математических моделей для описания скорости роста популяции микроорганизмов в рубце - это всего лишь бриколаж дилетантов. Бактерии рода *Lactobacillus* имеют слабые механизмы выживания в агрессивных условиях желудочно-кишечного тракта и проявляют жесткие потребности к питательным веществам, их рост может быть легко ингибирован многими веществами, присутствующими в пищеварительной системе.

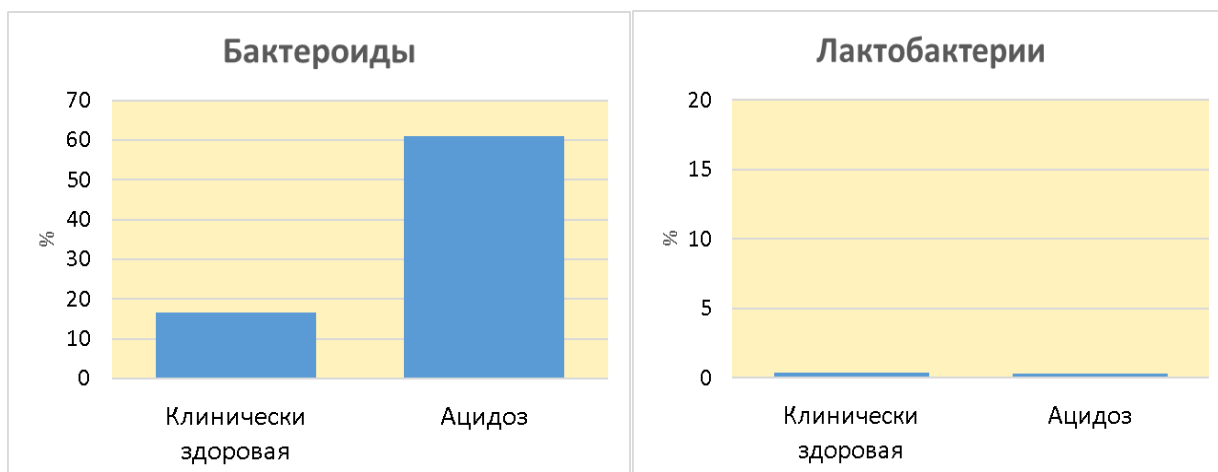


Рис. 3. Лактат-синтезирующие бактерии рубца коров методом NGS-секвенирования. Усредненные данные по 5 тыс. образцов (данные НПК «БИОТРОФ»)

Накопление молочной кислоты в результате активности бактериоидов вызывает ацидоз рубца, поскольку рубец уже не справляется с буферизацией и всасыванием кислот, поэтому его содержимое подкисляется. На данном фоне происходит подавление чувствительных к снижению уровня pH продуцентов ЛЖК, а также и целлюлозолитиков. При этом процессы переваривания клетчатки тормозятся, а скорость образования пропионата в рубце снижается, вследствие чего процесс глюконеогенеза (образования глюкозы) у животных замедляется. Это приводит к нарушению координации липидного обмена, что провоцирует возникновение кетоза (рис. 2).

В условиях ацидоза в рубце появляется опасная бактерия *Fusobacterium necrophorum*. Она провоцирует разрушение стенок рубца, печени, копыт, что в дальнейшем приводит к выбраковке животного.

МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ?

Как известно, продуцентами молочной кислоты могут являться как рубцовые микроорганизмы, так и бактерии, инициирующие процессы ферментации силоса. В связи с этим, за виновников лактатного ацидоза иногда ошибочно принимают молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, которые присутствуют в силосе. Тем не менее, из предыдущего раздела стало понятным, что лактатный ацидоз коров обусловлен перегрузкой рубца концентратами. При этом основные продуценты лактата в рубце животных – это амилолитические бактериоиды. Бактерии рода *Lactobacillus* представлены

в рубце в незначительных количествах, в том числе, и на фоне ацидоза, поскольку имеют низкую конкурентоспособность в условиях пищеварительной системы. Поэтому присутствие бактерий рода *Lactobacillus* в силосе, в большинстве случаев, не может являться причиной ацидоза коров.

Более того, потребление животными силоса позитивно влияет на их состояние здоровья. Клетчатка силоса оказывает механическое воздействие на стенки рубца, стимулируя моторную функцию, удлиняя процесс руминации, в результате чего происходит выделение значительных объемов слюны, создающей щелочную реакцию, что обеспечивает поддержание кислотности на оптимальном уровне pH.

Тем не менее, переокисленный силос (pH ниже 3,7), полученный при консервировании высокоуглеводного сырья и внесении избытка высокоактивных штаммов бактерий в составе заквасок, при определенных обстоятельствах может внести некоторый вклад в процесс развития ацидоза, возникшего на фоне высококонцентратного кормления. А именно, потенциал для развития ацидоза при скармливании переокисленного силоса может возникнуть в случае накопления в ходе ферментации избыточного количества D-изомера молочной кислоты.

Дело в том, что процесс образования лактата у микроорганизмов катализируется ферментами лактатдегидрогеназами двух видов: L и D. В результате деятельности этих ферментов образуются 2 оптических изомера молочной кислоты: L(+)-лактат и D(-)-лактат.

Установлено, что эти изомеры оказывают разные эффекты на здоровье жвачных животных. L-лактат не опасен и даже полезен для животных. Он быстро расщепляется в печени до пирувата, который используется для синтеза глюкозы, а, значит, энергии. Кроме того, L-лактат является важным поставщиком электронов для восстановления нитратов до аммиака в рубце.

D-лактат считается более токсичной формой, в отличие от L-лактата. Именно D-лактат и подавляет развитие полезных целлюлозолитиков и вейллионелл, продуцирующих летучие жирные кислоты. Он хуже утилизируется рубцовой микробиотой. Другим важным отличием между изомерами молочной кислоты является их способность к выведению почками, гораздо более низкая для D-лактата. Поэтому из 2-х изомеров молочной кислоты доля D-лактата в целом увеличивается с понижением уровня pH, усугубляя явление ацидоза.

ЛУЧШЕЕ ДОСТИЖЕНИЕ СЕЛЕКЦИИ

Поэтому при производстве силосных заквасок необходимо использование специально отселектированных микроорганизмов, направленно синтезирующих L-лактат.

При этом следует помнить, что свойства биопрепарата полностью зависят от штамма, входящего в его состав, и не могут экстраполироваться на весь вид, а уж, тем более, род, к которому он относится. Последние достижения в области молекулярной биологии привели к удивительным наблюдениям, главным из которых являлась необыкновенная геномная изменчивость бактерий в рамках каждого конкретного вида в связи высочайшей скоростью размножения этих микроорганизмов, способностью к горизонтальному переносу генов и быстрому накоплению значительного количества мутаций. Гаплоидность (наличие одинарного набора непарных хромосом) многих микроорганизмов обеспечивает проявление рецессивных (скрытых) мутаций, которые у диплоидных организмов могут быть «замаскированы» присутствием нормальной аллели, т.е. другой формы одного и того же гена.

Интересно, что консервативная часть генома — это гены, отвечающие за деление и рост клетки, синтез АТФ, нуклеиновых кислот и пр. А вот вариабельную его часть (то есть уникальную для каждого штамма) составляют именно те гены, которые напрямую связаны с биотехнологической активностью: это гены синтеза органических кислот, бактериоцинов и др.

Например, известно, что многие штаммы *Lactobacillus plantarum* продуцируют смесь равных количеств изомеров L- и D-лактата. Однако уже в догеномную эпоху было признано, что фенотипическое разнообразие в рамках вида *L. plantarum* очень велико. В последние годы обширный анализ фенотипического и геномного разнообразия *L. plantarum* подтвердил высокую молекулярную гибкость этого вида (рис. 4). Показано, что у различных штаммов бактерий в пределах одного вида *L. plantarum* лишь 80% генов сходны (консервативны), тогда как остальные 20% - вариабельны и уникальны для каждого штамма. Важную роль в геномной пластичности *L. plantarum* играет разнообразие молекулярных структур, таких как (конъюгативные) плазмиды, IS-элементы и транспозоны (Siezen, Vlieg, 2011).

Очевидно, что гетерогенность геномов бактерий внутри вида обуславливает разнообразие и фенотипических признаков, то есть свойств.

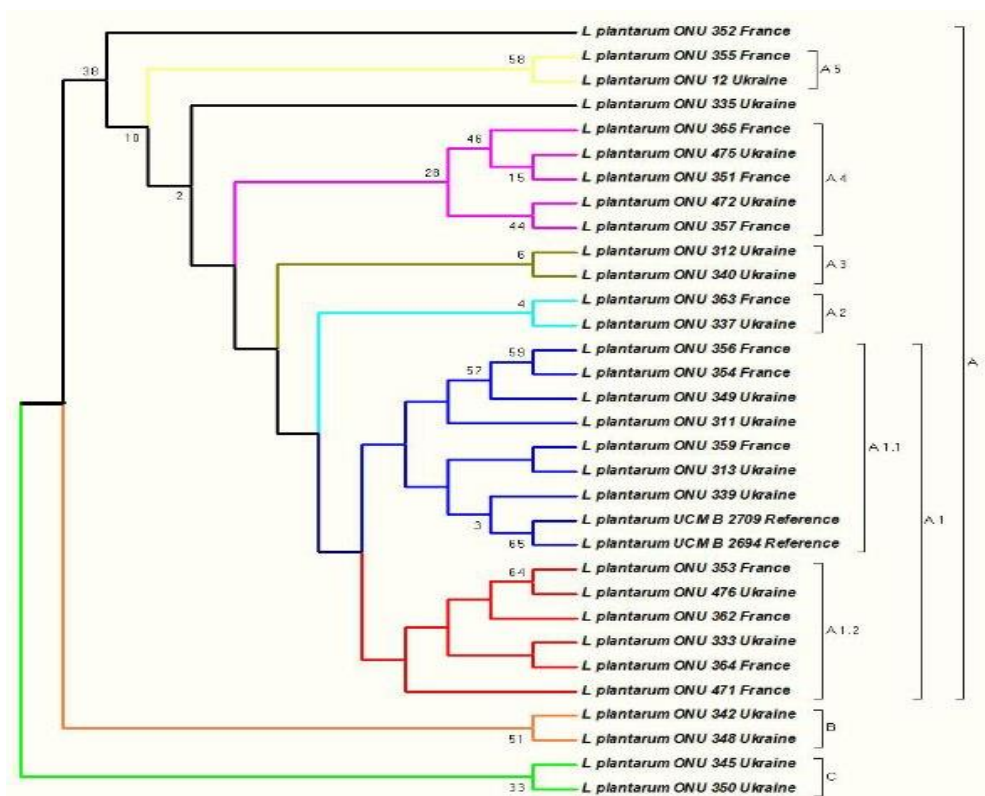


Рис. 4. Пример филогенетического разнообразия штаммов *L. plantarum*: обнаружено несколько кластеров (групп) штаммов с различными генами и свойствами (Limanska et al., 2019)

В частности, гибкое и адаптивное «поведение» *L. plantarum* было обнаружено и в генах, кодирующих L- и D-лактатдегидрогеназы. Например, в составе генома специально отселектированных штаммов ген, связанный с синтезом D-лактатдегидрогеназы, может быть полностью «выключен».

Примером закваски, производящей L-изомер лактата, является биопрепарат Биотроф2+ на основе *L. plantarum* и *Enterococcus faecium*. Мы провели анализ экспрессии генов синтеза ферментов L-лактатдегидрогеназы и D-лактатдегидрогеназы микробным сообществом силоса, который был заложен с закваской Биотроф2+ и без добавок. Экспрессия (работа) генов — это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК, а затем белок (например, фермент лактатдегидрогеназу). Таким образом, анализ экспрессии генов при помощи наблюдения за РНК методом количественной ПЦР позволяет обнаружить, какие гены силосных бактерий активируются в ответ на

выбранный прием консервирования, что может приводить к запуску синтеза соответствующего белка.

На рисунке 5 показан относительный уровень экспрессии генов синтеза L-лактатдегидрогеназы, связанных с продукцией L-лактата, в силосе с закваской Биотроф2+ по сравнению с контролем. Из графиков видно, что внесение закваски резко усиливало синтез силосными молочнокислыми бактериями L-лактата (до 851,2 раза!). А вот уровень синтез D-лактата не отличался от контрольного варианта.



Рис. 5. Увеличение экспрессии генов L-лактата в силосе (данные НПК «БИОТРОФ»)

Таким образом, с одной стороны, штаммы бактерии закваски Биотроф2+ специфически адаптируют свою метаболическую способность в силосе для синтеза L-лактата. С другой стороны, штаммы закваски, задействуя чувство кворума (внутривидовую и межвидовую коммуникацию), инициируют регуляторные реакции, которые непосредственно влияют на активность других лактобактерий сообщества силоса в направлении синтеза ими L-лактата.

ЛУЧШЕЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО - ВЫСОКИЕ НАДОИ

Многочисленные эксперименты подтверждают, что скармливание силоса, приготовленного с закваской Биотроф2+, сопровождается увеличением надоев коров и улучшением показателей качества молока. В частности, увеличение продуктивности было отмечено и для новотельных коров (рис. 6), которые в связи с резким введением концентратов в рацион,

стрессами от отела, начала лактации и отрицательным балансом энергии составляют основную группу риска развития метаболических нарушений.

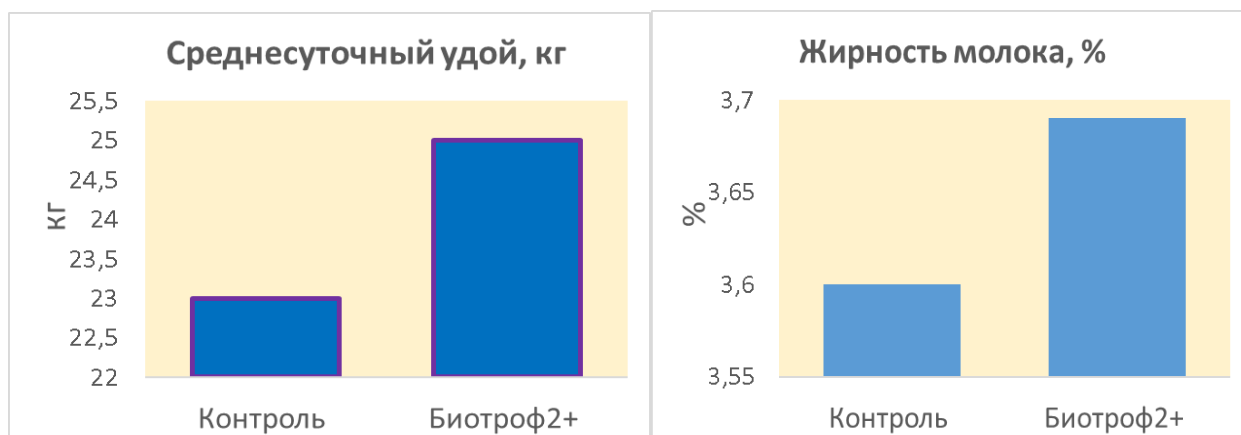


Рис. 6. Молочная продуктивность коров при скармливании силоса ($M \pm m$, $n=10$) (данные НПК «БИОТРОФ»)

Как показали результаты молекулярно-биологических методов, введение в рацион силоса, заложеного с закваской, позитивно влияет и на состав микроорганизмов рубца, нарушенный высококонцентратным кормлением: количество амилолитических бактериоидов, подкисляющих содержимое рубца, снижается, полезных целлюлозолитиков - увеличивается.

Итак, следует помнить, что серьезные проблемы обмена веществ коров, с которыми столкнулись высокопродуктивные хозяйства, связаны с введением большого количества комбикормов в рационы. Молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, присутствующие в силосе, не оказывают влияние на возникновение лактатного ацидоза. Тем не менее, потенциал для снижения pH рубца при скармливании переокисленного силоса может возникнуть в случае накопления в ходе ферментации избыточного количества D-изомера молочной кислоты. Штаммы бактерии закваски Биотроф2+ не только обеспечивают достижение в силосе целевых значений pH и максимальное сохранение питательных веществ, но и гарантируют оптимальный кислотный профиль - доминирование L-лактата.