

Аспирант **Т.П. ДУНЯШЕВ**
Доктор биол. наук **Г.Ю. ЛАПТЕВ**
Канд. биол. наук **Л.А. ИЛЬИНА**
Канд. биол. наук **Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ**
Соискатель **В.А. ФИЛИПОВА**
(ООО «БИОТРОФ»)

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Известно, что рубец северных оленей населен симбиотическими микроорганизмами: бактериями, грибами, археями, простейшими. Микрофлора рубца северного оленя играет важную роль в ферментации растительных кормов [1-2]. В летний период олени находятся на пастбищном содержании, их рацион состоит из смеси многолетних трав и кустарников. Зимой рацион северного оленя на 70% состоит из лишайников, которые очень токсичны для многих животных, например, для овец и коров, из-за содержания в них усниновой кислоты – метаболита лишайников. К немаловажным функциям анаэробной микрофлоры рубца северных оленей относят ее способность к детоксификации вторичных фенольных метаболитов лишайников: усниновой кислоты и др. [3-4]. Изучение микробиоценоза рубца северных оленей представляет значительный интерес в связи с адаптационно-физиологическими и анатомическими приспособлениями организма данных животных к неблагоприятным условиям их ареала обитания и питания.

Целью исследования являлось изучение микробиома рубца молодых и взрослых особей северных оленей *Rangifer tarandus* в летне-осенний период с применением молекулярно-генетических методов для использования полученных результатов в разработке кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы. Объектом исследования были молодые (1-2 года) и взрослые особи (3-6 лет) северных оленей *Rangifer tarandus* Ненецкой породы и их растительные корма. Образцы содержимого рубца и образцы растительных кормов отбирали в летне-осенний период в 2017 году. Образцы содержимого рубца отбирали от 3 особей из каждой группы.

Молекулярно-генетические исследования микробиоты рубца проводили в лаборатории компании ООО «БИОТРОФ+» (Санкт-Петербург) с применением T-RFLP-анализа для определения структуры (процентного содержания) компонентов бактериального сообщества [5].

Исследования питательности растительных кормов были проведены в областной ветеринарной лаборатории г. Санкт-Петербург.

Выделение штаммов бактерий с высокой целлюлозолазной активностью, антагонистическими свойствами в отношении патогенов и свойствами биодеструкции микотоксинов из рубцового содержимого от клинически-здоровых особей северного оленя, отобранного в летне-осенний период,

методом посева суспензий рубцовой жидкости на селективные питательные среды.

Определение целлюлозолитической активности выделенных изолятов проводили по методу Хендерсона, Хорвата и Блока в модификации Чюрлиса [6].

Результаты и выводы. Из табл. 1 видно, что показатели питательности растительных кормов северных оленей были сопоставимы с показателями питательности кормов из других регионов. Содержание сырой клетчатки в корме высокое. Избыточное содержание сырой клетчатки в рационах снижает переваримость и эффективность использования животными питательных веществ.

Анализ растений на микотоксины был проведен методом ИФА. В результате, содержание микотоксинов в кормовой базе северного оленя оказалось высоким (табл. 2). Такое количество микотоксинов в корме опасно для с/х животных, например, для коров. У лишайников количество микотоксинов выявлено меньше, чем в других растениях.

По результатам установлено, что в микробиоте рубца исследованных нами особей *Rangifer tarandus* выявлено большое содержание неидентифицируемых бактерий (табл. 3), а также представителей *Eubacteriaceae* и *Clostridiaceae*. Известно, что ряд представителей данных таксонов, по сообщениям авторов, проявляет способность к детоксикации усниновой кислоты и других вторичных метаболитов, продуцируемых лишайниками. Кроме того, они синтезируют целлюлозолитические ферменты, способные расщеплять клетчатку, которая содержится в значительных количествах в растениях, входящих в состав кормовой базы северного оленя.

Таблица 1. Исследование питательности кормов

Показатель	Результаты исследования
Токсичность	Не токсично
Корм. ед., г/кг	0,74
Массовая доля влаги, %	23,3
Сухое вещество, г/кг	732
Сырой жир, г/кг	12,39
Сырой протеин, г/кг	54,96
Сырая зола, г/кг	24,99
Сырая клетчатка, г/кг	134,62
Обменная энергия, Мдж	9,35
Массовая доля растворимых углеводов (сахаров), г/кг	13,85
БЭВ, г/кг	301,99
Кислотно-детергентная клетчатка, г/кг	172,51
Нейтрально-детергентная клетчатка, г/кг	315,91

Таблица 2. Исследование количества микотоксинов в кормах северного оленя

Микотоксин	Количество микотоксинов, мг/кг							
	Cladonia	Nephroma	V. uliginosum	S. borealis	Смесь многолетних трав	V. pendula	V. pana	Смесь компонентов рациона
Поселок Харп, Ямало-Ненецкий АО								
АФЛА	0,0051*	0,0033	0,1226	0,1285	0,0106	0,1111*	Исследование не проводили	0,0887**
ОТА	< п.д.о.**	< п.д.о.	0,0371*	0,0968	0,0007*	0,0895		0,041
Т-2	0,0385*	0,0179*	1,969*	1,021	0,0004	0,405		0,1058
ЗЕН	0,0365	0,1227	2,543*	2,444	0,1181	1,938		0,5172*
ДОН	0,003	0,15*	10,3	9,81	1,55*	< п.д.о.		1,7*
ЗЕН	0,0904	Исследование не проводили	0,4868*	1,251*	0,1937*	Исследование не проводили	1,7	0,7876*
ДОН	0,02*		0,13	2,6	1,02		33,8*	1,53

Примечание: * $p \leq 0,05$

Таблица 3. Бактериальное сообщество рубца северных оленей (T-RFLP-анализ), %

Встречаемость таксона, %	Молодые особи (1-2 года)	Взрослые особи (3-6 лет)
Неидентифицируемые бактерии	49,65±3,35	29,49±1,32*
фила <i>Bacteroidetes</i>	8,20±0,38	3,89±0,13*
класс <i>Clostridia</i>	9,08±0,40	32,52±1,65*
род <i>Lactobacillus</i>	4,16±0,19	4,71±0,27
род <i>Bacillus</i>	1,56±0,06	5,97±0,24*
род <i>Staphylococcus</i>	0,14±0,01	0,86±0,04*
класс <i>Negativicutes</i>	2,06±0,08	2,53±0,14
фила <i>Actinobacteria</i>	15,65±0,78	4,47±0,17*
род <i>Bifidobacterium</i>	0,25±0,02	0,15±0,01*
семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	0,64±0,03	7,59±0,12*
семейство <i>Campylobacteriaceae</i>	6,08±0,28	3,04±0,10*
семейство <i>Pseudomonadaceae</i>	0,91±0,03	1,94±0,43*
семейство <i>Burkholderiaceae</i>	0**	0,29±0,01
семейство <i>Succinivibrionaceae</i>	0	0,25±0,01
род <i>Mycoplasma</i>	0,82±0,02	1,48±0,04*
фила <i>Fusobacteria</i>	1,05±0,04	0,97±0,06

Примечание: * $P < 0,05$

Из рубцовой жидкости 2 клинически здоровых северных оленей возрастом 1-2 года было выделено 63 изолята. Для определения их перспективы в качестве биопрепарата были изучены целлюлозолитические свойства. 29% - проявили высокую целлюлазную активность и разрушали целлюлозу до 62% (табл. 4).

Таблица 4. Целлюлозолитическая активность выделенных изолятов

№ изолята	Вес с фильтром до инкубации, г	Вес после инкубации, г		Потери целлюлозы		Количество разложившейся целлюлозы, %
		I	II	мг	%	
7	3,69	3,62	3,62	80	4,0	4,0
	3,69	3,61	3,61	80	4,0	
14	3,65	2,53	2,53	880	44,0	44,0
	3,58	2,73	2,73	880	44,0	
15	3,58	2,63	2,63	950	47,5	47,8
	3,63	2,67	2,67	960	48,0	
21	3,65	2,55	2,55	1100	55,0	56,8
	3,7	2,53	2,53	1170	58,5	
24	3,63	3,28	3,28	360	18,0	17,8
	3,67	3,30	3,30	350	17,5	
26	3,7	2,46	2,46	1240	62,0	62,0
	3,73	2,49	2,49	1240	62,0	
37	2,98	2,79	2,79	190	10,0	9,5
	3,09	2,91	2,91	180	9,0	
46	2,95	2,83	2,83	120	6,0	6,0
	3,09	2,88	2,88	110	6,0	
51	2,99	2,78	2,78	210	11,0	10,0
	3,07	2,89	2,89	180	9,0	
58	2,97	2,43	2,43	540	27,0	25,5
	2,95	2,47	2,47	480	24,0	
К	2,99	2,99	2,99	0	0	0
	2,89	2,89	2,89	0	0	

Таким образом, полученные результаты могут быть использованы при разработке кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда для реализации научного проекта №17-76-20026 «Микробиоценоз рубца *Rangifer tarandus* Арктических регионов России как фундаментальная основа получения перспективных биотехнологий для сельскохозяйственных животных».

Литература

1. **Hungate R.E.** The Rumen and its Microbes.- NewYork: Academic Press. - 1996.
2. **Тараканов Б.В.** Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы.-М.: Научный мир, 2006. – 188 с.
3. **Orpin C.G., Mathiesen S.D., Greenwood Y., Blix A.S.** Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) // Applied and Environmental Microbiology. – 1985 – V. 50(1). - P.144-151.
4. **Sundset M.A., Kohn A., Mathiesen S.D., Praesteng K.E.** *Eubacterium rangiferina*, a novel uscing acid-resistant bacterium from the reindeer rumen // Natirwissenschaften. – 2008. – V. 95. – P.721-749.
5. **Брюханов М.А., Рыбак К.В., Путрусов А.И.** Молекулярная биология. – М: Изд-во МУ, 2012. – 480 с.
6. **Теппер Е.З., Шильникова В.К.** Практикум по микробиологии. - М.: Дрофа, 2004. – 165 с.