

Состав микрофлоры химуса пищеварительной системы и молочная продуктивность коров в период раздоя под влиянием комплексного биопрепарата

Е. А. Йылдырым^{1,2✉}, Л. А. Ильина^{1,2}, В. А. Филиппова^{1,2}, К. А. Калиткина^{1,2}, А. В. Дубровин²

¹ Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

✉ E-mail: deniz@biotrof.ru

Аннотация. Понимание взаимосвязей между микробиомом пищеварительной системы, применением пробиотических добавок и зоотехническими показателями у коров является ключом к разработке новых стратегий для повышения надоев. **Цель** исследований – изучить состав микрофлоры химуса пищеварительной системы и молочной продуктивности коров под влиянием комплексного биопрепарата. **Методы исследования.** Эксперимент проводили на коровах черно-пестрой голштинизированной породы. Были сформированы группы: контрольная I (получавшая основной рацион (ОР)) и опытная II (получавшая ОР и кормовую добавку «АнтиКлос»). Бактериальное сообщество рубца оценивали методом NGS-секвенирования, микрофлору кишечника, подстилки и корма – с использованием ПЦР в реальном времени. **Результаты** показали, что применение кормовой добавки «АнтиКлос» на поголовье скота позволило увеличить среднесуточные надои до 7,5 кг по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$). Самыми обильно представленными ($P \leq 0,05$) в рубце оказались бактерии *Bacteroidetes* – от $20,9 \pm 4,36$ и до $55,3 \pm 6,74$ %. Впервые показано, что под влиянием введения в рацион кормовой добавки «АнтиКлос» произошло также снижение в 16,1 раза бактерий филума *Fusobacteria* в опытной группе II по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$). Кроме того, применение кормовой добавки «АнтиКлос» приводило к полному исчезновению в рубце и таких видов, как *Streptococcus caprae*, *S. didelphis*, *Mycoplasma conjunctivae*, среди которых нередко встречаются условно-патогенные и патогенные формы, что составляет **научную новизну** исследования. В корме с кормового стола, подстилке и прямой кишке практически всех исследованных дойных коров встречались сходные таксоны бактерий. В химусе прямой кишки коров опытной группы снижалось по сравнению с контролем I количество таких таксонов, как *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus* spp. ($P \leq 0,05$). Таким образом, необходимо уделять внимание увеличению эффективности животноводства путем регуляции микробиомов коров, а также микрофлоры кормов и мест содержания.

Ключевые слова: микробиом, рубец, кишечник, NGS-секвенирование, АнтиКлос, количественная ПЦР, крупный рогатый скот.

Для цитирования: Йылдырым Е. А., Ильина Л. А., Филиппова В. А., Калиткина К. А., Дубровин А. В. Состав микрофлоры химуса пищеварительной системы и молочная продуктивность коров в период раздоя под влиянием комплексного биопрепарата // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 01. С. 46–58. DOI: 10.32417/1997-4868-2024-24-01-46-58.

Дата поступления статьи: 12.07.2023, **дата рецензирования:** 28.07.2023, **дата принятия:** 01.08.2023.

The composition of the microflora of the digestive system chyme and dairy productivity of cows during the milking period under the influence of a complex biological preparation

E. A. Yildirim^{1,2✉}, L. A. Ilyina^{1,2}, V. A. Filippova^{1,2}, K. A. Kalitkina^{1,2}, A. V. Dubrovin²

¹ Saint Petersburg State Agricultural University, Saint Petersburg, Pushkin, Russia

² BIOTROF LLC, Saint Petersburg, Russia

✉ E-mail: deniz@biotrof.ru

Abstract. Understanding the relationships between the microbiome of the digestive system, the use of probiotic supplements and zootechnical indicators in cows is the key to developing new strategies to increase milk yields. **Purpose of research** to study the composition of the microflora of the digestive system chyme and dairy productivity of cows under the influence of a complex biological preparation. **Research methods.** The experiment was carried out on cows of black-and-white holsteinized. Groups were formed: control group I (who received the main ration (MR)) and experimental group II (who received MR and the “AntiKlos” feed additive). The bacterial community of the scar was evaluated by NGS-sequencing, the intestinal microflora, litter and feed were evaluated using real-time PCR. **Results** showed that the use of the “AntiKlos” feed additive on livestock allowed to increase the average daily milk yield to 7.5 kg compared with control I ($P = 0.05$). The bacteria *Bacteroidetes* were the most abundantly represented ($P \leq 0.05$) in the rumen – from 20.9 ± 4.36 and up to 55.3 ± 6.74 %. It was shown for the first time that under the influence of the introduction of the “AntiKlos” feed additive into the diet, there was also a 16.1-fold decrease in *Fusobacteria* phylum bacteria in experimental group II compared with control I ($P < 0.05$). In addition, the use of the “AntiKlos” feed additive led to the complete disappearance of such species as *Streptococcus caprae*, *S. didelphis*, *Mycoplasma conjunctivae* in the rumen, among which opportunistic and pathogenic forms are often found, which is the **scientific novelty** of the study. Similar bacterial taxa were found in the food from the feed table, litter and rectum of almost all the dairy cows studied. In the rectal chyme of cows of the experimental group, the number of taxa such as *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus* spp. decreased in comparison with control I ($P \leq 0.05$). Thus it is necessary to pay attention to increasing the efficiency of animal husbandry by regulating the microbiomes of cows, as well as the microflora of feed and housing sites. **Keywords:** microbiome, scar, intestine, NGS-sequencing, AntiKlos, quantitative PCR, cattle

For citation: Yildirim E. A., Ilyina L. A., Filippova V. A., Kalitkina K. A., Dubrovin A. V. Sostav mikroflory khimusa pishchevaritel'noy sistemy i molochnaya produktivnost' korov v period razdoya pod vliyaniem kompleksnogo biopreparata [The composition of the microflora of the digestive system chyme and dairy productivity of cows during the milking period under the influence of a complex biological preparation] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2024. Vol. 24, No. 01. Pp. 46–58. DOI: 10.32417/1997-4868-2024-24-01-46-58. (In Russian.)

Date of paper submission: 12.07.2023, **date of review:** 28.07.2023, **date of acceptance:** 01.08.2023.

Постановка проблемы (Introduction)

В ходе эволюции позвоночные животные, включая и жвачных, утратили способность вырабатывать ферменты, которые разлагают целлюлозу и другие сложные некрахмалистые полисахариды [1]. Симбиотическая микробиота рубца помогает организму коров, продуцируя энзимы, которые расщепляют эти соединения на более простые молекулы для легкого всасывания. Микроорганизмы участвуют и в таких жизненно важных процессах, как синтез летучих жирных кислот, глюконеогенез, поддержание резистентности [2]. Для своего правильного функционирования система «хозяин – микробиом» должна обеспечить оптимальную среду и субстраты для поддержания баланса микрофлоры. Дис-

биоз микробиома, проникновение инфекционных микроорганизмов через корм, окружающую среду и другие факторы могут приводить к нарушениям метаболизма хозяина и возникновению инфекционных заболеваний [3].

На протяжении последних десятилетий при производстве молока основное внимание уделялось максимизации надоев, что вынуждало обогащать рационы источниками крахмала и моносахаров. Организм коров не всегда может физиологически приспособиться к резкому увеличению энергии и легкопереваримых веществ в рационе, что приводит к метаболическим заболеваниям, снижению резистентности и надоев [4]. Микробиом пищеварительной системы защищает животное-хозяина от угроз

окружающей среды и заболеваний с помощью различных механизмов, включая модуляцию иммунной системы. Нарушение микробиома может приводить к колонизации желудочно-кишечного тракта патогенной микрофлорой с последующим выделением экзотоксинов [5]. Появляется все больше доказательств, свидетельствующих о важности здоровья симбиотического микробиома как средства профилактики инфекционных заболеваний пищеварительной системы, мастита и респираторных заболеваний.

Существуют сведения о позитивном влиянии пробиотиков на продуктивность [6], а также об их эффективности в предотвращении колонизации организма патогенами [7].

Следует также иметь в виду, что микрофлора, связанная с кормами, местами обитания животных и самими животными, признается неотъемлемой частью взаимосвязанной системы, вносящей значительный вклад в производственные процессы в отрасли скотоводства [8]. Вероятно, микрофлора кормов и подстилки может являться источником заселения пищеварительной системы и резервуаром патогенной микрофлоры.

Таким образом, понимание взаимосвязей между рубцовым и кишечным микробиомом, применением пробиотических добавок и здоровьем коров является ключом к разработке новых стратегий для профилактики распространения инфекционных заболеваний и повышения надоев.

Цель – изучение методом NGS-секвенирования микробиома рубца, методом количественной ПЦР структуры микрофлоры химуса кишечника коров в период раздоя под влиянием комплексной растительно-бактериальной кормовой добавки «АнтиКлос», а также состава микрофлоры корма и подстилки для животных.

Методология и методы исследования (Methods)

Эксперимент проводили в коммерческом племенном заводе Ленинградской области под условным номером 1 на коровах черно-пестрой голштинизированной породы 2-й и 3-й лактации с продуктивностью 10 500 кг. Были сформированы группы-аналоги: контрольная I (получавшая ОР) и опытная II (получавшая ОР и «АнтиКлос»), по 10 животных в каждой группе. Кормовая добавка раздавалась вручную каждой голове опытной группы II по 50 г/гол/сут в новотельный период и раздоя начиная с 1-го дня после отела. Продолжительность дачи добавки составляла 90 дней. Рационы коров были рассчитаны автоматически с использованием программы AMTS.Cattle.Professional (<https://agmodelsystems.com>) в соответствии с общепринятыми требованиями. В том числе рацион включал на 1 голову в сутки: силос – 33 кг, сено – 1 кг, комбикорм – 14 кг. Живая масса коров составляла 600 кг. Содержание животных привязное. Животные находились в одинаковых условиях содержания.

Кормовая добавка «АнтиКлос» содержит в своем составе штамм микроорганизма *Bacillus* sp., а также органические кислоты и натуральные растительные вещества (надземные вегетативные части хвойных растений) с антибактериальным и противовоспалительным действием. Клетки штамма *Bacillus* sp. представляют собой неподвижные палочки с округлыми концами. Штамм образует овальные споры, расположенные субтерминально, не является генетически модифицированным организмом, не имеет свойств токсигенности и вирулентности, компоненты клеток штамма не токсичны для лабораторных животных.

Отбор проб содержимого рубца, прямой кишки коров, проб корма с кормового стола, а также подстилки (в трех повторностях) проводили в конце эксперимента (в период раздоя) с максимально возможным соблюдением условий асептики. Отбор проб химуса рубца (30–50 г) проводили из верхней части вентрального мешка рубца коров с использованием стерильного зонда. Отобранные образцы немедленно помещали в стерильные пластиковые пробирки. Все образцы замораживали при -20°C и транспортировали в сухом льду в лабораторию для последующего выделения ДНК.

Среднесуточный удой оценивали ежемесячно методом контрольных доек. Количество соматических клеток в молоке коров оценивали ежемесячно по ГОСТ Р 54761-201.

Тотальную ДНК из образцов выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) согласно прилагаемой инструкции. Бактериальное сообщество содержимого рубца оценивали методом NGS-секвенирования на автоматическом секвенаторе MiSeq (Illumina, Inc., США) с применением праймеров для V3-V4 региона 16S рРНК: 5'-TCGTCG GCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAC GGGNGGCWGCAG-3' (прямой праймер), 5'-GTC TCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGG ACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (обратный праймер). Условия ПЦР были следующими: 3 мин. при 95°C , 30 с при 95°C , 30 с при 55°C , 30 с при 72°C (необходимо для удлинения последовательности) (25 циклов); 5 мин. при 72°C (окончательное удлинение). Секвенирование проводили при помощи реагентов для подготовки библиотек Nextera® XT IndexKit (Illumina, Inc., США), для очистки ПЦР-продуктов Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., США) и для проведения секвенирования MiSeq® ReagentKit v2 (500 cycle) (Illumina, Inc., США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2×250 п. н.

Автоматический биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения QIIME2 ver. 2020.8 (<https://docs.qiime2.org/2020.8>). После импорта последовательностей в

формате .fastq из секвенирующего прибора и создания необходимых для работы файлов сопоставления (содержащих метаданные изучаемых файлов) парные строки прочтений были выровнены. Далее последовательности фильтровали по качеству с использованием параметров настроек по умолчанию. Фильтрацию шумовых последовательностей проводили с помощью встроенного в программное обеспечение QIIME2 пакета DADA2, включающего информацию о качестве последовательностей в свою модель ошибок (фильтрацию химерных последовательностей, артефактов, адаптеров), что делает алгоритм устойчивым к последовательности более низкого качества. При этом использовали максимальную длину последовательности обрезки, равную 250 п. н. (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). Для построения филогении de novo выполнили множественное выравнивание последовательностей, применяя программный пакет MAFFT, далее проводили маскированное выравнивание, чтобы удалить позиции, которые значительно различались. Для назначения таксономии использовали программное обеспечение QIIME2, которое присваивает последовательности таксономическую идентификацию на основе данных ASV (методами

BLAST, RDP, RTAX, mothur и uclust), используя базу данных по 16s rRNA Silva 138.1 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138.1>).

ПЦР в реальном времени содержимого кишечника, образцов подстилки и корма проводили с использованием амплификатора детектирующего ДТ Lite-4 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с помощью Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (ЗАО «Синтол», Россия) и праймеров (5'-3'), перечень которых приведен в таблице 1. Использовали следующие условия амплификации: 95 °С – 3 мин. (1 цикл), 95 °С – 1 мин., 57,6 °С – 1 мин., 72 °С – 1 мин. (40 циклов), 72 °С 5 мин. (1 цикл).

Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли методом многофакторного дисперсионного анализа (multifactor ANalysis Of VAriance, ANOVA) в программах Microsoft Excel XP/2003, R-Studio (Version 1.1.453) (<https://rstudio.com>). Достоверность различий устанавливали по *t*-критерию Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$. Средние значения сравнивали с использованием теста достоверно значимой разницы Тьюки (HSD) и функции TukeyHSD в пакете R Stats Package.

Таблица 1
Праймеры к микроорганизмам

№ п/п	Микроорганизмы	Праймеры (5'-3')
1	<i>Streptococcus</i> spp.	F: AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGTCGAGCGAACAGACGA R: TGTCACCGGCAGTCAACTTA
2	<i>Clostridium</i> spp.	F: GTGAAATGCGTAGAGATTAGGAA R: GATYYGCGATTACTAGYAACTC
3	<i>Atopobium</i> spp.	F: AGTTTGATCCTGGCTCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG
4	<i>Staphylococcus</i> spp.	F: GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC R: TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A
5	<i>Fusobacteriaceae</i>	F: CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT R: TGGTCCTCACTGATTACACAGA
6	<i>Enterobacteriaceae</i>	F: CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C R: CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC

Table 1
Primers for microorganisms

No.	Microorganisms	Primers (5'-3')
1	<i>Streptococcus</i> spp.	F: AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGTCGAGCGAACAGACGA R: TGTCACCGGCAGTCAACTTA
2	<i>Clostridium</i> spp.	F: GTGAAATGCGTAGAGATTAGGAA R: GATYYGCGATTACTAGYAACTC
3	<i>Atopobium</i> spp.	F: AGTTTGATCCTGGCTCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG
4	<i>Staphylococcus</i> spp.	F: GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC R: TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A
5	<i>Fusobacteriaceae</i>	F: CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT R: TGGTCCTCACTGATTACACAGA
6	<i>Enterobacteriaceae</i>	F: CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C R: CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC

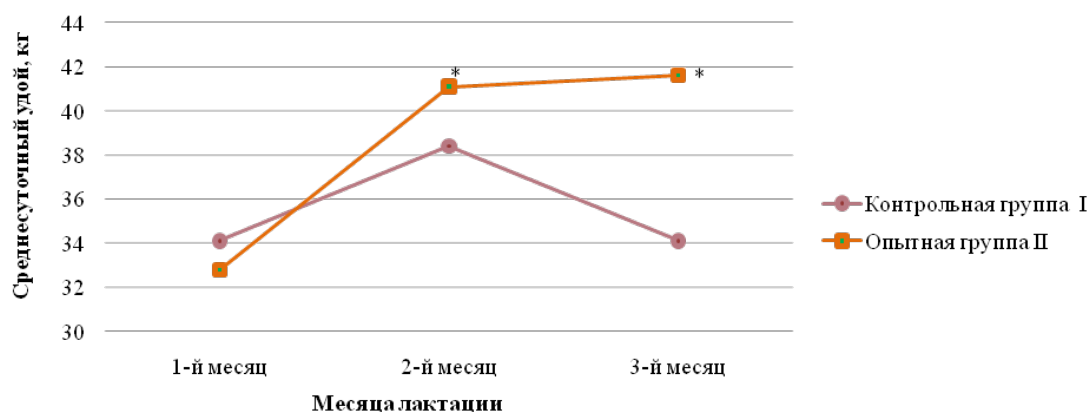


Рис. 1. Среднесуточный удой коров черно-пестрой голштинизированной породы в эксперименте по изучению действия кормовой добавки «АнтиКлос» (* $P \leq 0,05$)

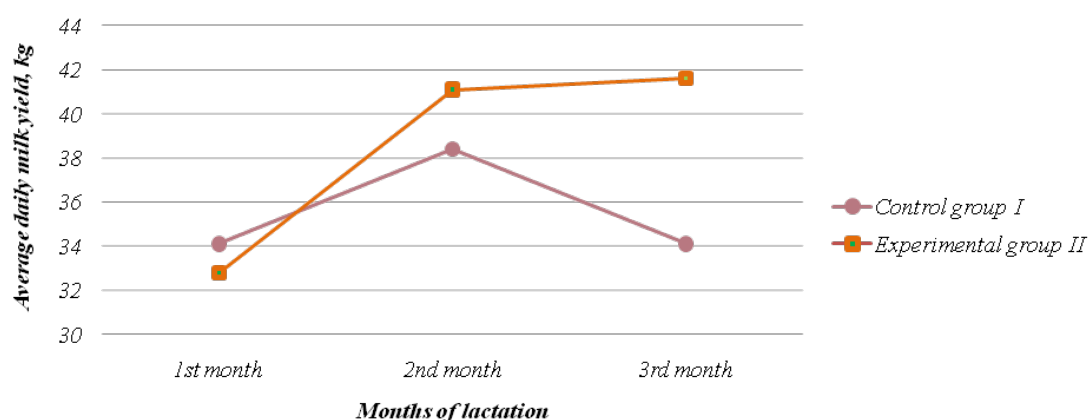


Fig. 1. Average daily milk yield of black-and-white holsteinized cows at the experiment to study the feed additive "AntiKlos" (* $P \leq 0.05$)

Результаты (Results)

Результаты научно-хозяйственного эксперимента показали, что применение кормовой добавки «АнтиКлос» (опытная группа II) на поголовье скота позволило увеличить на 2-й месяц эксперимента среднесуточные надои на 2,7 кг молока, на 3-й – на 7,5 кг молока по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$) (рис. 1).

Кроме того, через месяц после начала введения в рацион кормовой добавки «АнтиКлос» (группа II) наблюдалось снижение количества соматических клеток в молоке коров в 3 раза по сравнению с контролем I ($P \leq 0,01$) (рис. 2). Тем не менее на 2-й месяц лактации показатель количества соматических клеток в опытной группе II несколько превышал контрольный ($P \leq 0,05$), не выходя за границы норм у здоровых животных.

Проведение NGS-секвенирования состава микробиома содержимого рубца исследованных коров контрольной и опытной групп продемонстрировало, что в составе микрофлоры в период раздоя было выявлено 28 филумов микроорганизмов, а также неклассифицируемые бактерии (рис. 3). Доминирующими у всех животных оказались филумы Bacteroidetes и Firmicutes. Самыми обильно представленными ($P \leq 0,05$) в рубце оказались бактерии филума

Bacteroidetes – от $20,9 \pm 4,36$ в рубце животного № 6 опытной группы II до $55,3 \pm 6,74$ % в рубце коровы № 1 контрольной группы I. В среднем их количество под влиянием кормовой добавки «АнтиКлос» (опытная группа II) снижалось на 11,7 % по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$).

Кроме того, обращает на себя внимание снижение в 16,1 раза количества бактерий филума *Fusobacteria* в опытной группе II по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$). В то же время в опытной группе II под влиянием «АнтиКлоса» возрастала численность *Verrucomicrobia* ($P \leq 0,05$).

По результатам анализа микрофлоры содержимого рубца исследованных коров на уровне семейств были установлены различия ($P \leq 0,05$) между контрольной и опытной группами по 30 семействам (рис. 4). Обращает на себя особое внимание увеличение в 4,9 раза в опытной группе II суммарного содержания таких семейств, как *Bacillaceae_1*, *Bacillaceae_2*, *Bacillales_incertae_sedis*, *Bacillales_Incertae_Sedis_X* и *Bacillales_Incertae_Sedis_XI* ($P \leq 0,05$). Интересно также снижение количества некоторых семейств клостридий, относящихся к порядку *Clostridiales* в опытной группе II по сравнению с контролем I ($P \leq 0,05$).

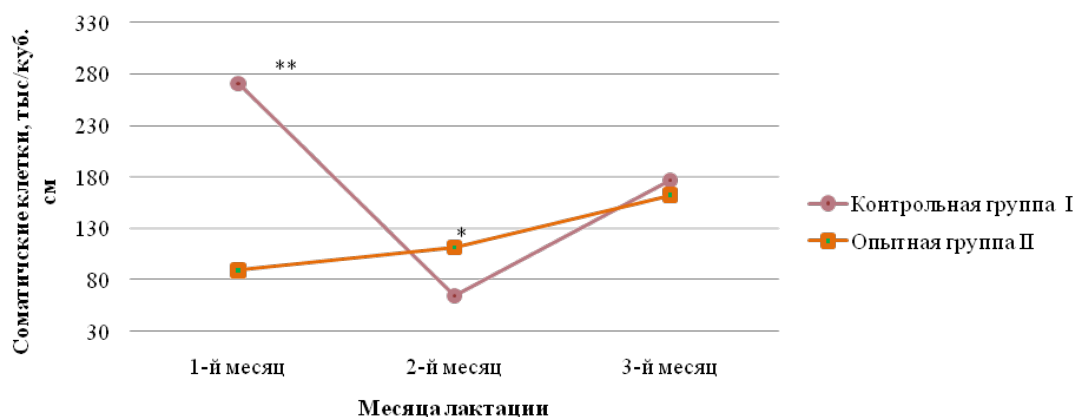


Рис. 2. Содержание соматических клеток в молоке коров черно-пестрой голштинизированной породы в эксперименте по изучению действия кормовой добавки «АнтиКлос» (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$)

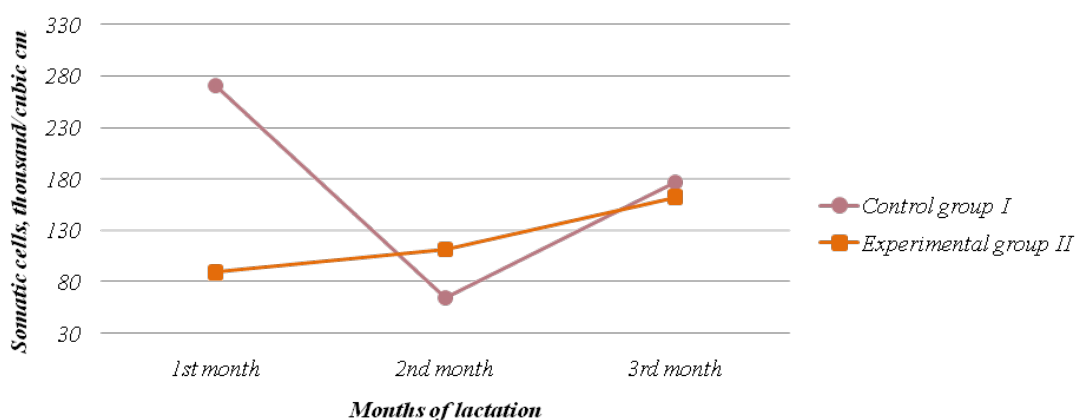


Fig. 2. The content of somatic cells in the milk of black-and-white holsteinized cows in an experiment to study the feed additive "AntiKlos" (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$)

Более детальная оценка состава микрофлоры на уровне родов и видов показала, что в составе микрофлоры рубца были выявлены таксоны, среди которых нередко встречаются условно-патогенные и патогенные микроорганизмы (рис. 5). Однако суммарное количество микроорганизмов данных групп не превышало 1 %. В рубце животного № 4 из опытной группы II не было обнаружено данных нежелательных микроорганизмов, представленных у других подопытных животных. В целом применение кормовой добавки «АнтиКлос» приводило к полному исчезновению таких видов, как *Streptococcus caprae*, *S. didelphis*, *Fusobacterium gastroisuis*, *F. nucleatum*, *Mycoplasma conjunctivae*.

Результаты, полученные методом количественной ПЦР, также показали, что в корме с кормового стола, подстилке и прямой кишке практически всех исследованных дойных коров встречались сходные таксоны бактерий, среди которых нередко встречаются условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, включая *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Atopobium* spp., *Staphylococcus* spp. (таблица 2). В химусе прямой кишки коров опытной группы снижалось по сравнению с контролем I количество таких таксонов, как *Clostridium*

spp., *Enterobacteriaceae* ($P \leq 0,05$) и *Staphylococcus* spp. ($P \leq 0,01$).

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Мы изучили методом NGS-секвенирования микробиом рубца, методом количественной ПЦР – структуру микрофлоры химуса кишечника коров в период раздоя под влиянием комплексной растительно-бактериальной кормовой добавки «АнтиКлос», а также состав микрофлоры корма и подстилки для животных.

Результаты показали, что применение кормовой добавки «АнтиКлос» приводило к увеличению надоев и снижению соматических клеток в молоке в первый месяц применения (рис. 1). Ранее при проведении эксперимента на поголовье голштинских коров исследователями было показано, что использование пробиотика на основе *Saccharomyces cerevisiae* приводило к снижению количества соматических клеток на 15-й день скармливания добавки. Был сделан вывод, что позитивные результаты были получены вследствие восстановления иммунитета под влиянием пробиотика: в крови были отмечены высокие уровни циркулирующих цитокинов (фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-4 (IL4) и интерферона (IFN)).

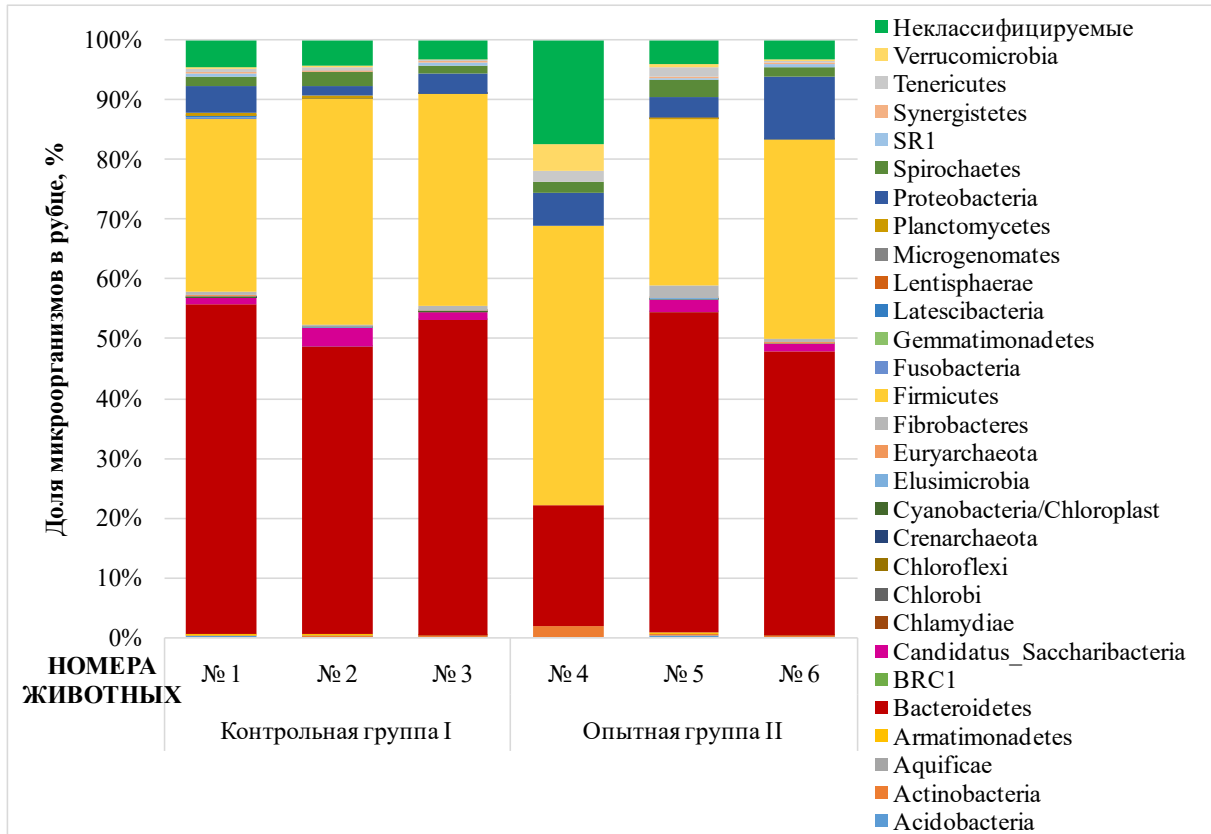


Рис. 3. Состав микрофлоры рубца коров черно-пестрой голштинизированной породы на уровне бактериальных филумов по данным NGS-секвенирования ампликонов гена 16S rPHK

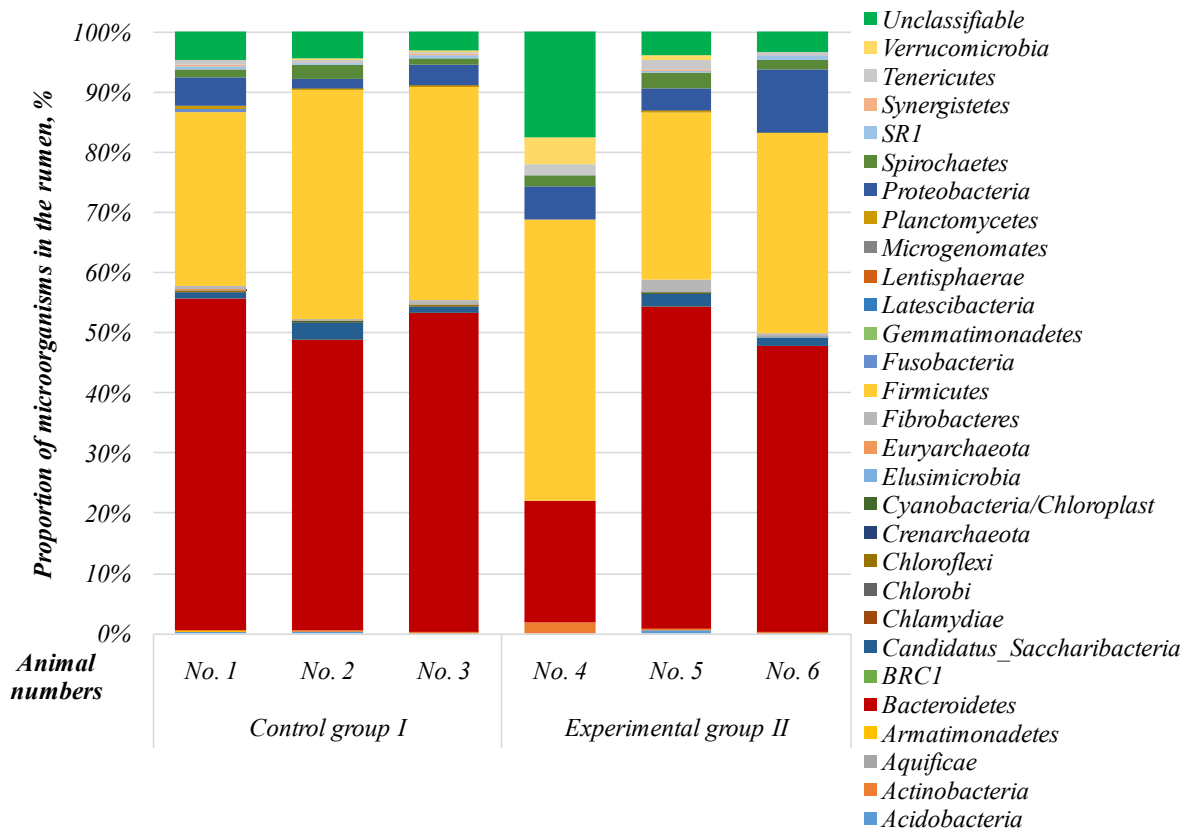


Fig. 3. Composition of the microflora of the rumen of cows of black-and-white holsteinized breed at the level of bacterial phylum according to NGS-sequencing of amplicons of the 16S rRNA gene

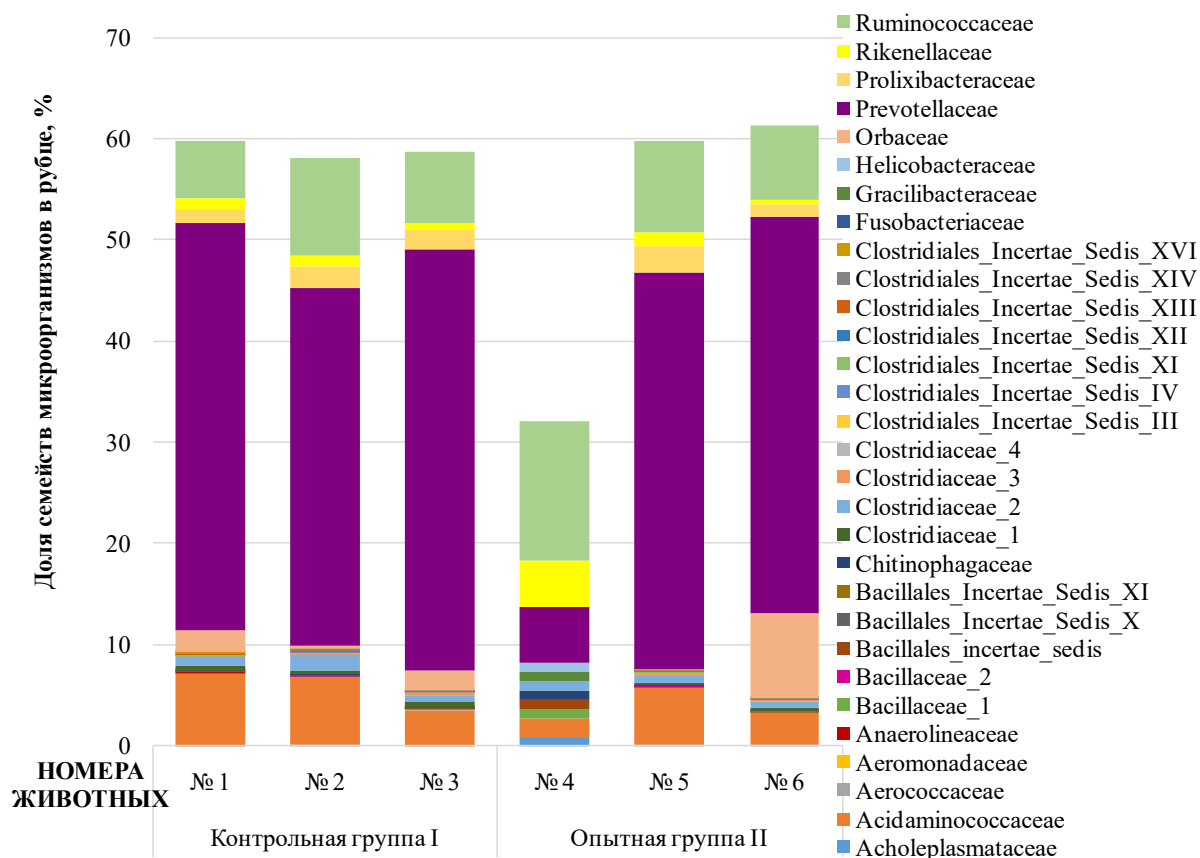


Рис. 4. Состав микрофлоры рубца коров черно-пестрой голштинизированной породы на уровне бактериальных семейств, содержание которых достоверно различалось в опытной и контрольной группах ($P \leq 0,05$), по данным NGS-секвенирования ампликонов гена 16S рРНК

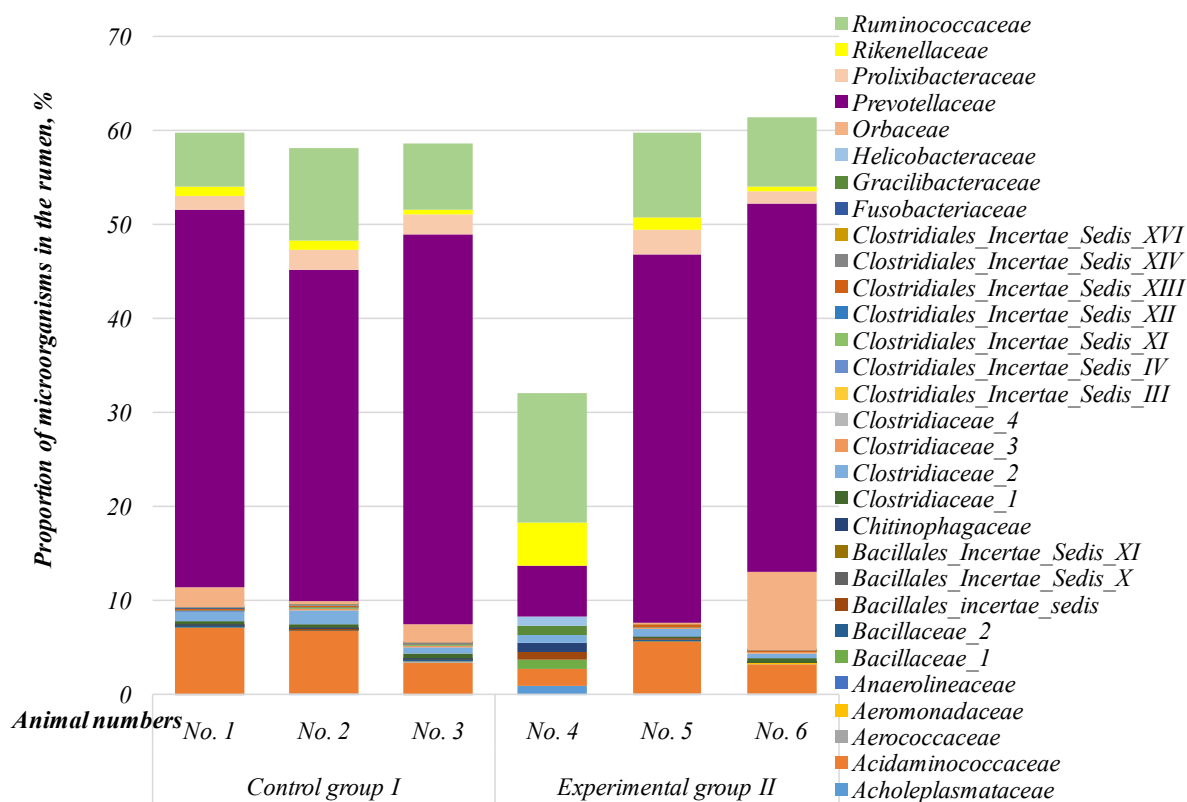


Fig. 4. The composition of the microflora of the rumen of cows of black-and-white holsteinized breed at the level of bacterial families, the contents of which significantly differed between the experimental and control groups ($P \leq 0.05$) according to NGS-sequencing of amplicons of the 16S rRNA gene

Таблица 2

Содержание в корме с кормового стола, подстилке и прямой кишке дойных коров таксонов бактерий, среди которых нередко встречаются условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, методом количественной ПЦР, 10² геномов/г

№	Группы бактерий	Корм	Подстилка	Химус прямой кишки	
				Контрольная группа I	Опытная группа II
1	<i>Clostridium</i> spp.	1,0 × 10 ⁵ ± 8,01 × 10 ³	1,3 × 10 ⁴ ± 0,92 × 10 ²	6,3 × 10 ³ ± 0,40 × 10 ²	2,5 × 10 ³ ± 13,80**
2	Enterobacteriaceae	1,6 × 10 ⁴ ± 0,85 × 10 ²	1,6 × 10 ⁵ ± 9,22 × 10 ³	1,8 × 10 ² ± 3,27	1,3 ± 0,07**
3	<i>Atopobium</i> spp.	1,6 ± 0,081	1,0 ± 0,07	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,004
4	Fusobacteriaceae	13 ± 0,79	10 ± 0,87	< п. д. о.	< п. д. о.
5	<i>Staphylococcus</i> spp.	2,5 × 10 ³ ± 16,75	2,5 × 10 ³ ± 15,44	16,1 ± 0,97	0,4 ± 0,04***
6	<i>Streptococcus</i> spp.	40,0 ± 2,96	40,2 ± 3,12	< п. д. о.	< п. д. о.

Примечание. < п. д. о. – ниже предела достоверного определения методом количественной ПЦР, **P ≤ 0,05 по сравнению с контрольной группой I, ***P ≤ 0,01 по сравнению с контрольной группой I.

Table 2

The content in the feed from the feed table, litter and rectum of dairy cows, bacterial taxa, among which conditionally pathogenic and pathogenic microorganisms are often found by quantitative PCR, 10² genomes/g

No.	Groups of bacteria	Foddering	Litter	Rectum chyme	
				Control group I	Experienced group II
1	<i>Clostridium</i> spp.	1.0 × 10 ⁵ ± 8.01 × 10 ³	1.3 × 10 ⁴ ± 0.92 × 10 ²	6.3 × 10 ³ ± 0.40 × 10 ²	2.5 × 10 ³ ± 13.80**
2	Enterobacteriaceae	1.6 × 10 ⁴ ± 0.85 × 10 ²	1.6 × 10 ⁵ ± 9.22 × 10 ³	1.8 × 10 ² ± 3.27	1.3 ± 0.07**
3	<i>Atopobium</i> spp.	1.6 ± 0.081	1.0 ± 0.07	0.02 ± 0.002	0.03 ± 0.004
4	Fusobacteriaceae	13 ± 0.79	10 ± 0.87	< l.r.d.	< l.r.d.
5	<i>Staphylococcus</i> spp.	2.5 × 10 ³ ± 16.75	2.5 × 10 ³ ± 15.44	16.1 ± 0.97	0.4 ± 0.04***
6	<i>Streptococcus</i> spp.	40.0 ± 2.96	40.2 ± 3.12	< l.r.d.	< l.r.d.

Note. <l.r.d. – below the limit of reliable determination by quantitative PCR, **P ≤ 0.05 compared to control group I, ***P ≤ 0.01 compared to control group I.

Проведение нами NGS-секвенирования состава микробиома содержимого рубца исследованных коров контрольной и опытной групп показало, что доминирующими у всех животных оказались филумы *Bacteroidetes* и *Firmicutes* (рис. 3). Эти таксоны были ранее признаны «коровым микробиомом» (ядром) рубца коров, а также кишечника других млекопитающих. Снижение численности *Bacteroidetes* под влиянием кормовой добавки «АнтиКлос» имеет позитивное значение, потому что в рубце на фоне используемых в настоящее время рационов, перенасыщенных моносахарами, крахмалом и энергией, нередко наблюдается увеличение доли данных микроорганизмов. Они используют крахмал для синтеза летучих жирных кислот (ЛЖК) и молочной кислоты, однако избыточная продукция лактата и ЛЖК связана со снижением pH рубца и может приводить к каскаду метаболических заболеваний [9]. Снижение бактерий филума *Fusobacteria* при введении в рацион кормовой добавки также имеет положительное значение, поскольку увеличение численности представителя фузобактерий *Fusobacterium necrophorum* в рубце высокопродуктивных животных традиционно связывают с метаболическими заболеваниями. Известно, что из рубца, где данный микроорганизм питается молочной

кислотой и белками слизистой эпителия, он может попадать в портальную систему кровообращения и размножаться в печени, вызывая абсцессы. Основными факторами, способствующими колонизации рубца и инвазии в печень, являются гематоглинин, эндотоксин и лейкотоксин. Снижение *Verrucomicrobia* в опытной группе могло сказаться на увеличении эффективности гидролиза полисахаридов кормов, включая труднопереваримую клетчатку.

Увеличение численности семейств, таких как *Bacillaceae 1*, *Bacillaceae 2*, *Bacillales incertae sedis*, *Bacillales Incertae Sedis X* и *Bacillales Incertae Sedis XI* в опытной группе, может свидетельствовать о выживаемости штамма бацилл в составе кормовой добавки в условиях рубца, что ранее было отмечено для микроорганизмов данной группы и рядом других исследователей. Важно отметить и снижение численности некоторых семейств клостридий, относящихся к порядку *Clostridiales* в опытной группе. Среди представителей данного таксона встречаются патогенные токсинообразующие формы (например, *Clostridium difficile* и *C. perfringens*). Ранее также было показано, что различные пробиотические бактерии могут ингибировать патогенные клостридии [10].

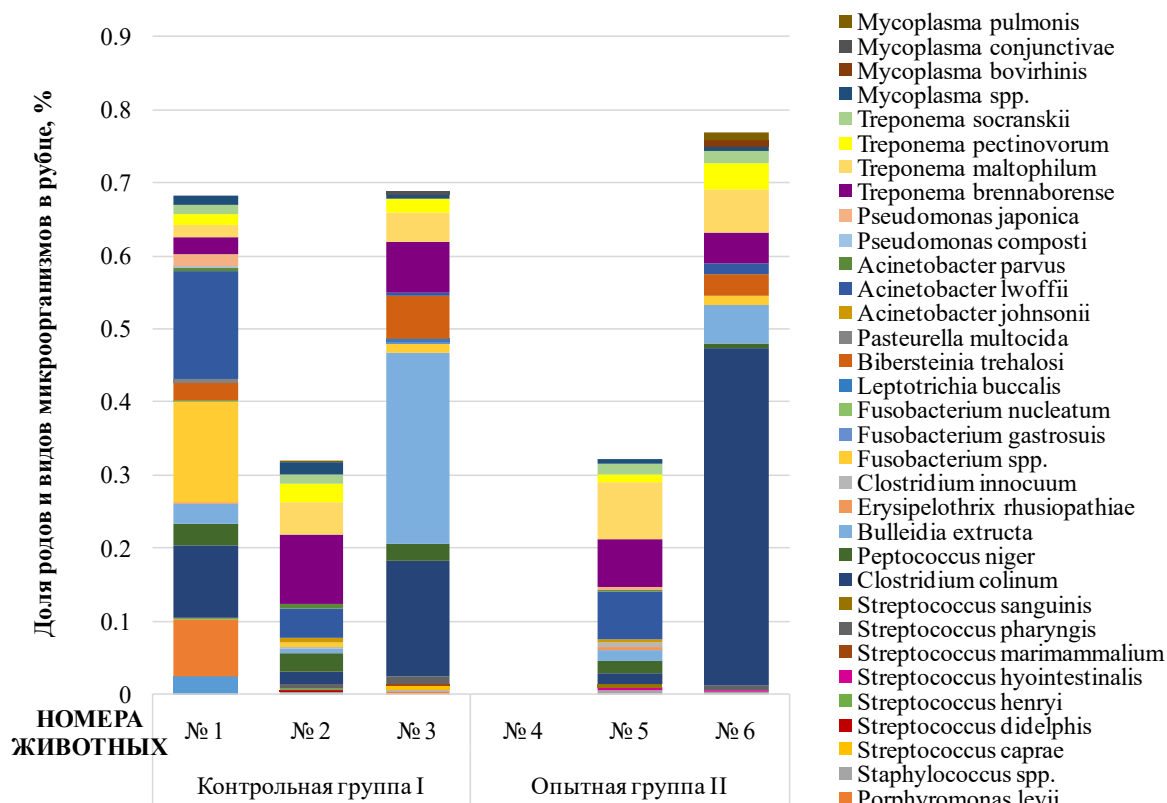


Рис. 5. Состав патогенной и оппортунистической микрофлоры рубца коров черно-пестрой голштинизированной породы на уровне бактериальных родов и видов по данным NGS-секвенирования ампликонов гена 16S рРНК

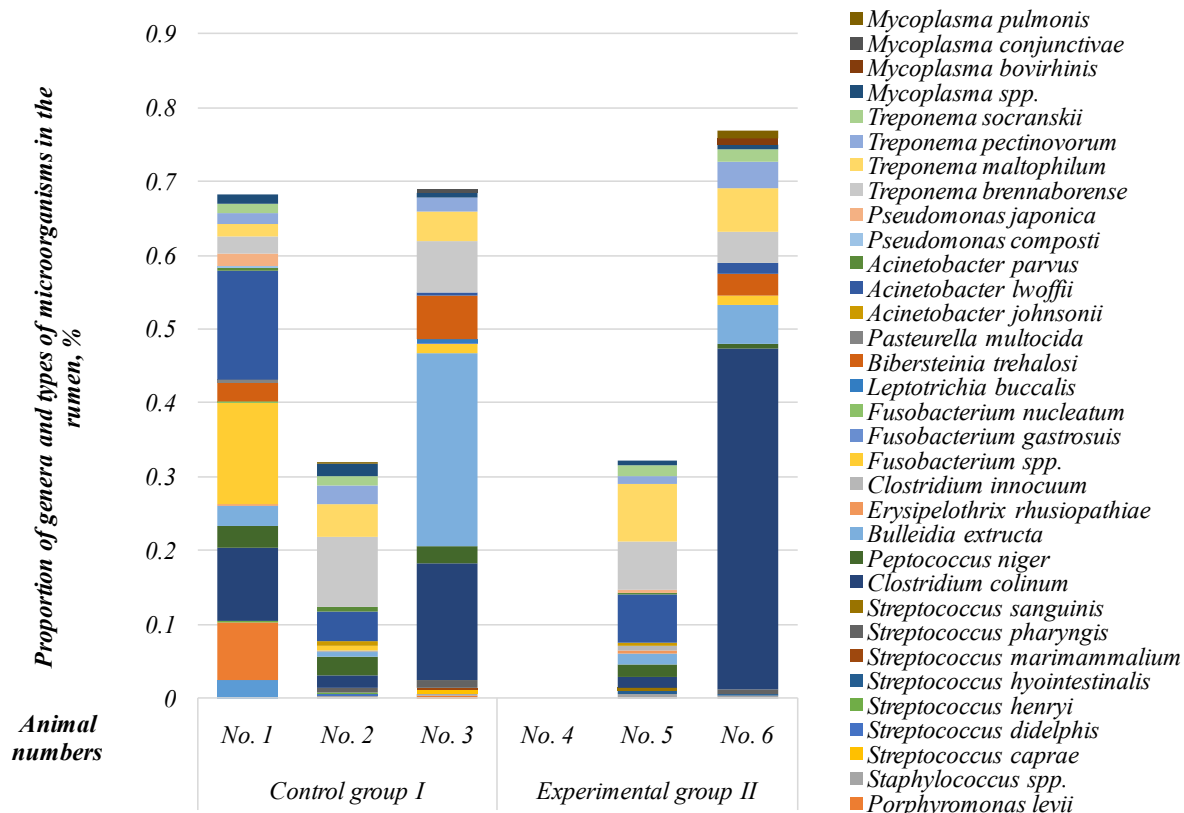


Fig. 5. Composition of pathogenic and opportunistic microflora of the rumen of black-and-white holsteinized cows at the level of bacterial genera and species according to NGS-sequencing of amplicons of the 16S rRNA gene

Кроме того, применение кормовой добавки «АнтиКлос» приводило к полному исчезновению в рубце и таких видов, как *Streptococcus caprae*, *S. didelphis*, *Fusobacterium gastrovuis*, *F. nucleatum*, *Mycoplasma conjunctivae*, среди которых нередко встречаются условно-патогенные и патогенные формы. Например, *Streptococcus* sp. – это грамположительные факультативно анаэробные бактерии. Представители этого рода связаны с возникновением маститов коров, могут продуцировать факторы вирулентности и экспрессировать гены устойчивости к антибиотикам в фекалиях крупного рогатого скота, что было показано в предыдущих исследованиях. Ранее учеными было показано, что микробиота рубца имеет связь с количеством соматических клеток в молоке, а также заболеваемостью маститом и другими воспалительными заболеваниями. Исследователи продемонстрировали, что у коров с высоким уровнем соматических клеток в молоке по сравнению с коровами с низким их содержанием наблюдалось не только снижение удоев, но и более низкая концентрация ЛЖК в рубце. При этом найдено более высокое бактериальное разнообразие в рубце и увеличенное количество филумов *SRI*, *Actinobacteria* и *Clostridiales*.

По нашему мнению, изменения в составе микробиоты рубца под влиянием кормовой добавки «АнтиКлос» могли иметь связь с увеличением молочной продуктивности подопытных коров, а также изменением содержания соматических клеток в молоке на протяжении эксперимента. Ранее исследователи также отмечали, что микробный состав рубца в некоторой степени связан со здоровьем вымени, а также коррелирует с надоями молока.

Помимо этого, результаты, полученные нами методом количественной ПЦР, также показали, что в корме с кормового стола, подстилке и прямой кишке практически всех исследованных дойных коров встречались сходные таксоны бактерий, среди которых нередко встречаются условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, включая *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Atopobium* spp., *Staphylococcus* spp. (таблица 2). Это может свидетельствовать о циркуляции патогенов в условиях фермы, перекрестном заражении, а также позволяет судить о резервуарах патогенных форм, таких как корма и подстилка. Так, *Staphylococcus aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* и *S. agalactiae* вызывают мастит коров и представляют основной риск для животных, особенно в новотельный период. Ранее показано, что данные бактерии распространяются из зараженных помещений в неинфицированные, заселяя организм коров, выживая и размножаясь в молочной железе [11]. Cobirka M. с соавторами [12] также полагают, что многие патогены, вызывающие мастит, такие как золотистый стафилококк, могут передаваться несколькими путями – не только че-

рез зараженное молоко от инфицированных коров или плохую гигиену во время доения, но и через подстилку, мочу, фекалии и другие загрязняющие вещества. В более ранних исследованиях также была показана взаимосвязь микрофлоры молока и подстилки [13].

Кроме того, обнаруженные нами в кишечнике, корме и подстилке энтеробактерии также могут представлять опасность как для животных, так и для человека – потребителя продукции животноводства. Ранее показано, что кишечник жвачных животных – это наиболее важный резервуар для STEC (энтеробактерий, вырабатывающих Шигатоксин) [14]. Считается, что молочный скот, особенно телята после отъема и телки, могут быть бессимптомными носителями STEC, вследствие чего данные бактерии могут широко распространиться в условиях молочной фермы.

Таким образом, необходимо уделять особое внимание увеличению эффективности молочного животноводства путем регуляции микробиомов коров. Изменения в рационе кормления животных путем включения эффективных пробиотиков могут повлиять на увеличение молочной продуктивности и снижение соматических клеток в молоке. Мы показали, что распространенность различных патогенов, включая зоонозные, на фермах подчеркивает значение контроля безопасности кормов, важность санитарно-гигиенических мероприятий, а также пастеризации молока для снижения заболеваемости животных и обеспечения производства безопасной продукции. Представленные нами данные совпадают и с мнением других исследователей [15].

Такие целостные подходы на уровне микробных сообществ к оценке сложных мультитрофических связей и коммуникации между микроорганизмами, животными, их кормами в рамках технологической цепи производства на ферме требуют применения ряда новых инструментов и подходов, таких как молекулярно-генетические методы.

Учитывая тот факт, что зоонозные патогены могут быть занесены в животноводческие хозяйства через корма и такие виды деятельности, как сбор урожая и торговля скотом, это увеличивает риск дальнейшей передачи данных патогенов в цепочке производства молока. Однако требуются более масштабные исследования для выявления подобных связей и закономерностей.

Благодарности (Acknowledgements)

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №23-16-20007 и гранта Санкт-Петербургского научного фонда № 23-16-20007 «Разработка комплексного биотехнологического подхода для биологической защиты КРС и продукции животноводства от патогенных бактерий и их токсинов».

Библиографический список (References)

1. Hua D., Hendriks W. H., Xiong B., Pellikaan W. F. Starch and Cellulose Degradation in the Rumen and Applications of Metagenomics on Ruminal Microorganisms // *Animals (Basel)*. 2022. No 12 (21). Article number 3020. DOI: 10.3390/ani12213020.
2. Nogal A., Valdes A. M., Menni C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health // *Gut microbes*. 2021. No 13 (1). DOI: 10.1080/19490976.2021.1897212.
3. Xu Q., Qiao Q., Gao Y., Hou J., Hu M., Du Y., Zhao K., Li X. Gut Microbiota and Their Role in Health and Metabolic Disease of Dairy Cow // *Frontiers in nutrition*. 2021. No. 8. Article number 701511. DOI: 10.3389/fnut.2021.701511.
4. Gross J. J., Bruckmaier R. M. Review: Metabolic challenges in lactating dairy cows and their assessment via established and novel indicators in milk // *Animal*. 2019. No 13 (S1). Pp. s75–s81. DOI: 10.1017/S175173111800349X.
5. Simpson K. M., Callan R. J., Van Metre D. C. Clostridial Abomasitis and Enteritis in Ruminants // *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2018. No. 34 (1). Pp. 155–184. DOI: 10.1016/j.cvfa.2017.10.010.
6. Nalla K., Manda N. K., Dhillon H. S., Kanade S. R., Rokana N., Hess M., Puniya A. K. Impact of Probiotics on Dairy Production Efficiency // *Frontiers in microbiology*. 2022. No. 13. Article number 805963. DOI: 10.3389/fmicb.2022.805963.
7. Cull C., Singu V. K., Cull B. J., Lechtenberg K. F., Amachawadi R. G., Schutz J. S., Bryan K. A. Efficacy of Two Probiotic Products Fed Daily to Reduce Clostridium perfringens-Based Adverse Health and Performance Effects in Dairy Calves // *Antibiotics (Basel)*. 2022. No. 11 (11). Article number 1513. DOI: 10.3390/antibiotics11111513.
8. Attwood G. T., Wakelin S. A., Leahy S. C., Rowe S., Clarke S., Chapman D. F., Muirhead R., Jacobs J. M. E. Applications of the Soil, Plant and Rumen Microbiomes in Pastoral Agriculture // *Frontiers in nutrition*. 2019. No. 6. Article number 107. DOI: 10.3389/fnut.2019.00107.
9. Monteiro H. F., Faciola A. P. Ruminal acidosis, bacterial changes, and lipopolysaccharides // *Journal of animal science*. 2020. No. 98 (8). Article number skaa248. DOI: 10.1093/jas/skaa248.
10. Al Sharaby A., Abugoukh T. M., Ahmed W., Ahmed S., Elshaikh A. O. Do Probiotics Prevent Clostridium difficile-Associated Diarrhea? // *Cureus*. 2022. No. 14 (8). Article number e27624. DOI: 10.7759/cureus.27624.
11. Zigo F., Farkašová Z., Výrostková J., Regecová I., Ondrašovičová S., Vargová M., Sasáková N., Pecka-Kielb E., Bursová Š., Kiss D. S. Dairy Cows' Udder Pathogens and Occurrence of Virulence Factors in Staphylococci // *Animals (Basel)*. 2022. No. 12 (4). Article number 470. DOI: 10.3390/ani12040470.
12. Cobirka M., Tancin V., Slama P. Epidemiology and Classification of Mastitis // *Animals (Basel)*. 2020. No. 10 (12). Article number 2212. DOI: 10.3390/ani10122212.
13. Wu H., Nguyen Q. D., Tran T. T. M., Tang M. T., Tsuruta T., Nishino N. Rumen fluid, feces, milk, water, feed, airborne dust, and bedding microbiota in dairy farms managed by automatic milking systems // *Animal science journal*. 2019. No. 90 (3). Pp. 445–452. DOI: 10.1111/asj.13175.
14. Kim J. S., Lee M. S., Kim J. H. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Its Potential Reservoirs // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020. No. 10. Pp. 273. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00273.
15. Aytekin İ., Altay Y., Boztepe S., Keskin İ., Zulkadir U. The effect of body cleanliness (hygiene) score on some criteria used in the detection milk quality in dairy cattle // *Large Animal Review*. 2021. No. 27 (2). Pp. 69–74.

Об авторах:

Елена Александровна Йылдырым^{1,2}, доктор биологических наук, профессор кафедры крупного животноводства¹, главный биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории², ORCID 0000-0002-5846-5105, AuthorID 714700; deniz@biotrof.ru

Лариса Александровна Ильина^{1,2}, доктор биологических наук, профессор кафедры крупного животноводства¹, начальник молекулярно-генетической лаборатории², ORCID 0000-0003-2789-4844, AuthorID 673421; ilina@biotrof.ru

Валентина Анатольевна Филиппова^{1,2}, заведующий лабораторией¹, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории², ORCID 0000-0001-8789-9837, AuthorID 162830; flippova@biotrof.ru

Ксения Андреевна Калиткина^{1,2}, аспирант факультета зооинженерии и биотехнологий¹, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории², ORCID 0000-0002-9541-6839, AuthorID 1178935; kseniya.k.a@biotrof.ru

Андрей Валерьевич Дубровин², кандидат ветеринарных наук, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории, ORCID 0000-0001-8424-4114, AuthorID 927021; dubrovin@biotrof.ru

¹ Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

Authors' information:

Elena A. Yildirim^{1,2}, doctor of biological sciences, professor of the department of large livestock¹, chief biotechnologist of the molecular genetic laboratory², ORCID 0000-0002-5846-5105, AuthorID 714700; *deniz@biotrof.ru*

Larisa A. Ilyina^{1,2}, doctor of biological sciences, professor of the department of large livestock¹, head of the molecular genetic laboratory², ORCID 0000-0003-2789-4844, AuthorID 673421; *ilina@biotrof.ru*

Valentina A. Filippova^{1,2}, head of the laboratory¹, biotechnologist of the molecular genetic laboratory², ORCID 0000-0001-8789-9837, AuthorID 162830; *filippova@biotrof.ru*

Kseniya A. Kalitkina^{1,2}, postgraduate of the faculty of animal engineering and biotechnology¹, biotechnologist of the molecular genetic laboratory², ORCID 0000-0002-9541-6839, AuthorID 1178935; *kseniya.k.a@biotrof.ru*

Andrey V. Dubrovin², candidate of veterinary sciences, biotechnologist of the molecular genetic laboratory, ORCID 0000-0001-8424-4114, AuthorID 927021; *dubrovin@biotrof.ru*

¹ Saint Petersburg State Agricultural University, Saint Petersburg, Pushkin, Russia

² BIOTROF LLC, Saint Petersburg, Russia