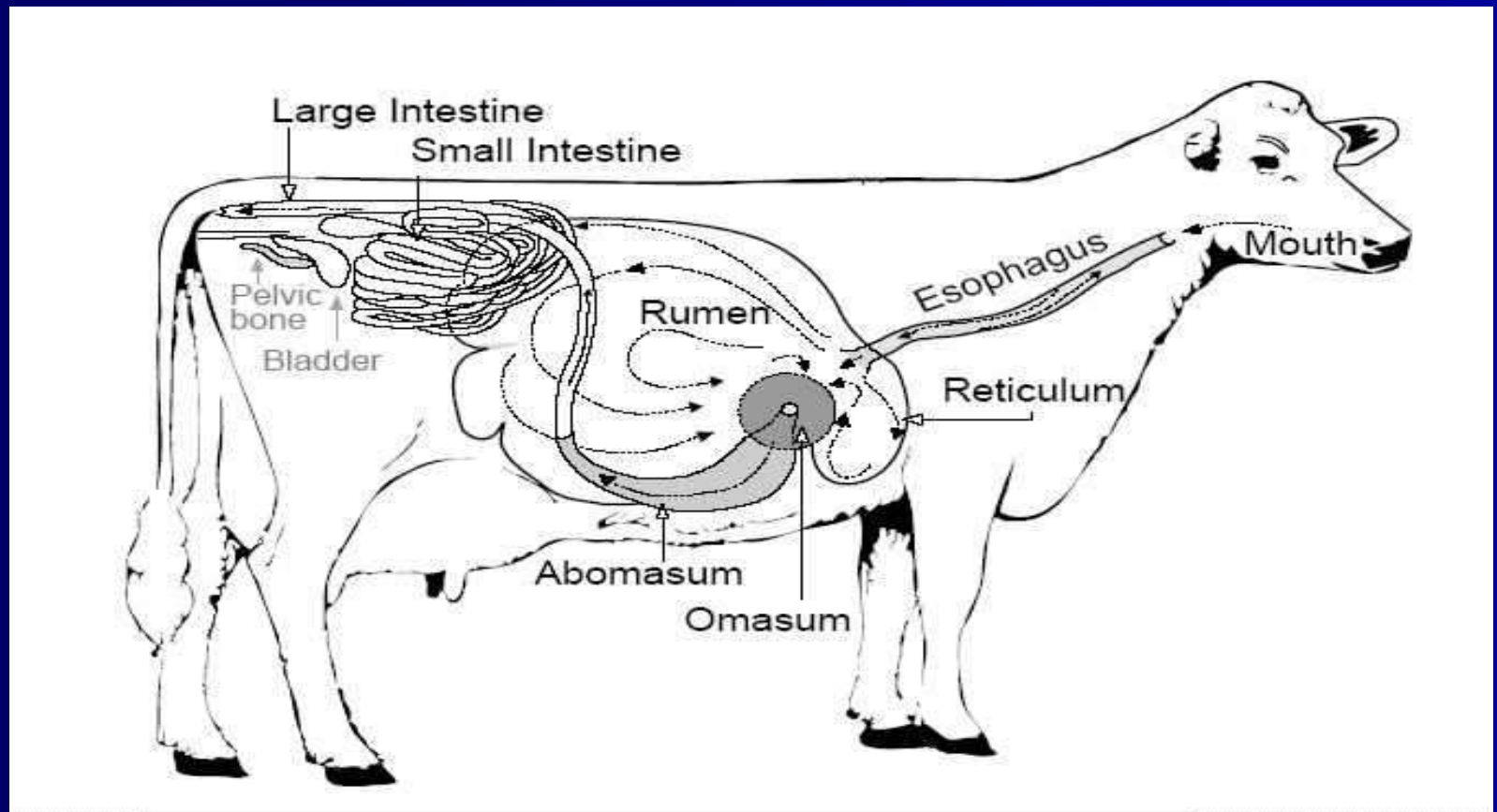


Хитридиомицеты рубца жвачных животных

Д.б.н. Лаптев Г.Ю., ООО БИОТРОФ



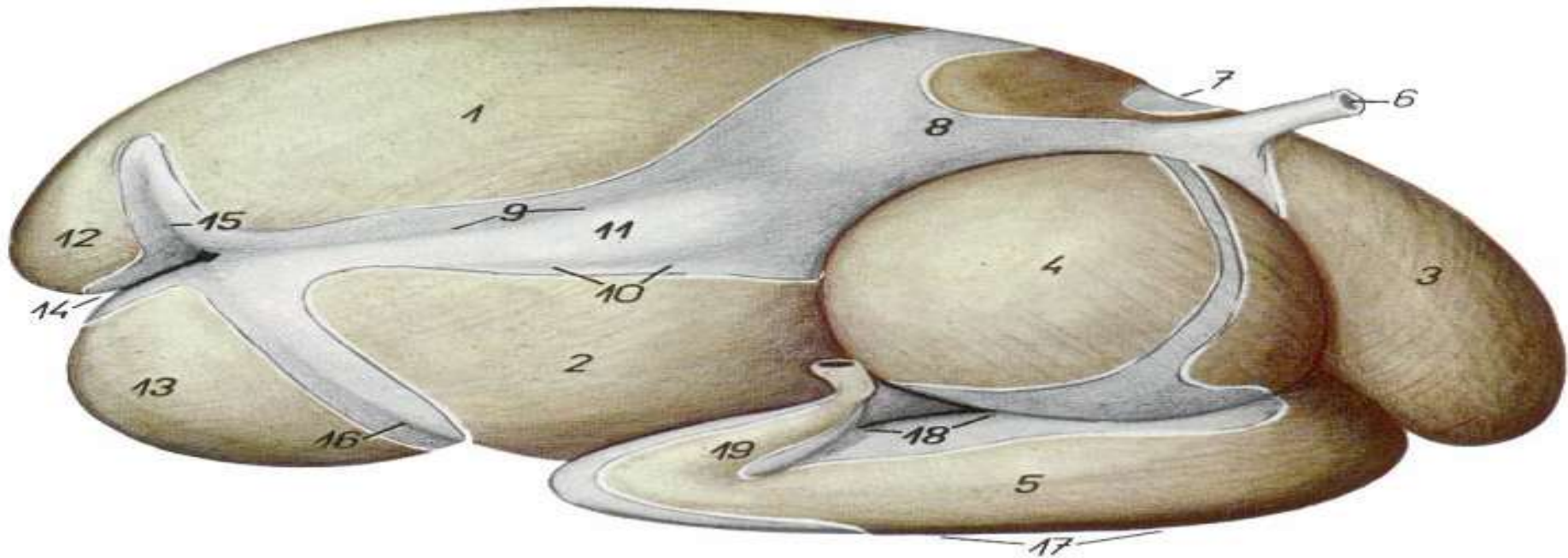
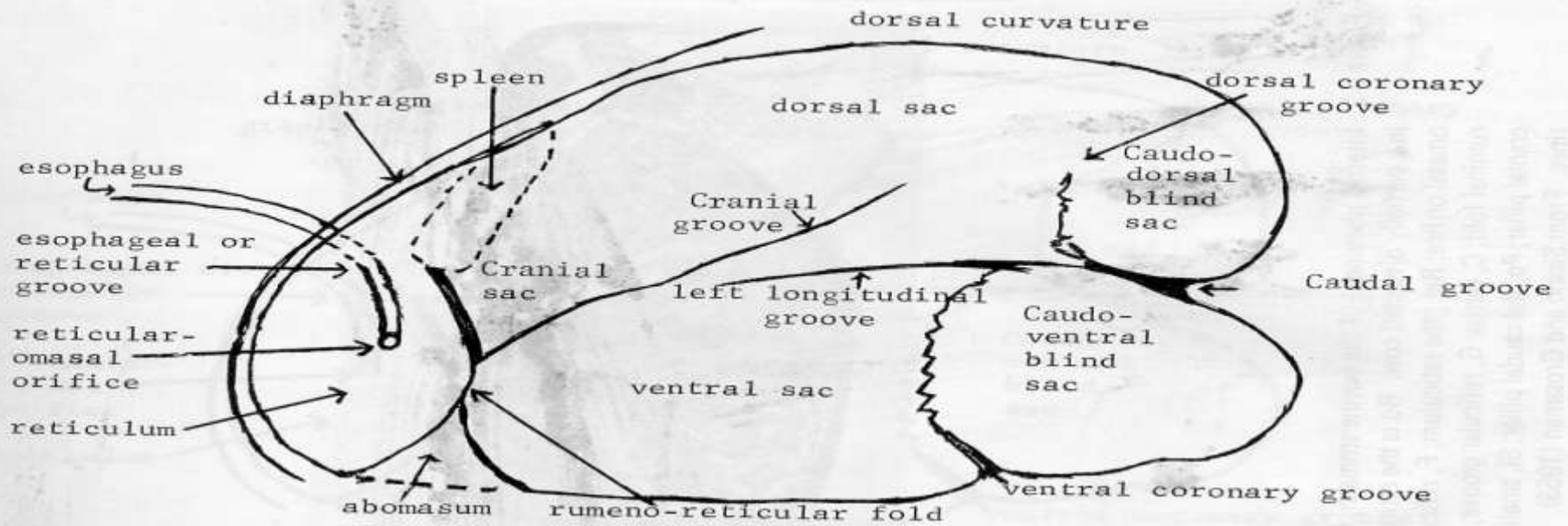
Пищеварительная система жвачных животных



Вклад животного

- Постоянство температуры
- Постоянство pH – буферные свойства слюны
- Обеспечение питательными веществами
(1. поедаемый корм, 2. Подача мочевины через слюну и стенку рубца)

Left or Parietal Surface





Cow rumen

Микроорганизмы рубца крупного рогатого скота



Бактерии

300 ВИДОВ

10^{10} to 10^{11} КЛ/МЛ



Грибы

30 ВИДОВ

$<10^5$ КЛ/МЛ



Простейшие

40 ВИДОВ

$<10^5$ КЛ/МЛ



Метаногенные археи

6 ВИДОВ

10^6 to 10^8 КЛ/МЛ



Микрофлора рубца

- Строго симбиотическая микрофлора (анаэробные бактерии-целлюлозолитики, хитридиомицеты, метаногены)
- Транзитные микроорганизмы (микрофлора корма и пр. – бациллы, псевдомонады, молочнокислые, азотфиксаторы и пр.)









indwelling pH electrode

Симбионтная микрофлора в пищеварении ЖВАЧНЫХ

Основные бактерии, расщепляющие целлюлозу

Bacteroides succinogenes
Ruminococcus flavefaciens
Ruminococcus albus
Butyrivibrio fibrisolvens

Основные бактерии, расщепляющие пектин

Butyrivibrio fibrisolvens
Bacteroides ruminicola
Lachnospira multiparus
Succinivibrio dextrinosolvens
Treponema bryantii
Streptococcus bovis

Основные бактерии, расщепляющие мочевину

Succinivibrio dextrinosolvens
Selenomonas sp.
Bacteroides ruminicola
Ruminococcus bromii
Butyrivibrio sp.
Treponema sp.

Основные бактерии, ферментирующие кислоты

Megasphaera elsdenii
Selenomonas ruminantium

Основные аммиак-образующие бактерии

Bacteroides ruminicola
Megasphaera elsdenii
Selenomonas ruminantium

Основные протеолитические (расщепляющие белки) бактерии

Bacteroides amylophilus
Bacteroides ruminicola
Butyrivibrio fibrisolvens
Streptococcus bovis

Основные липид-утилизирующие бактерии

Anaerovibrio lipolytica
Butyrivibrio fibrisolvens
Treponema bryantii
Eubacterium sp.
Fusocillus sp.
Micrococcus sp.

Основные бактерии, расщепляющие сахара

Treponema bryantii
Lactobacillus vitulinus
Lactobacillus ruminus

Основные бактерии, расщепляющие - гемицеллюлозу

Butyrivibrio fibrisolvens
Bacteroides ruminicola
Ruminococcus sp.

Основные амилолитические бактерии (расщепляющие крахмал)

Bacteroides amylophilus
Streptococcus bovis
Succinimonas amylolytica
Bacteroides ruminicola

Основные метанообразующие бактерии

Methanobrevibacter ruminantium
Methanobacterium formicum
Methanomicrobium mobile

Source: Church, D. C., ed. The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, 1988.

Роль симбионтной микрофлоры в пищеварении жвачных

Преобразование питательных веществ кормов в:

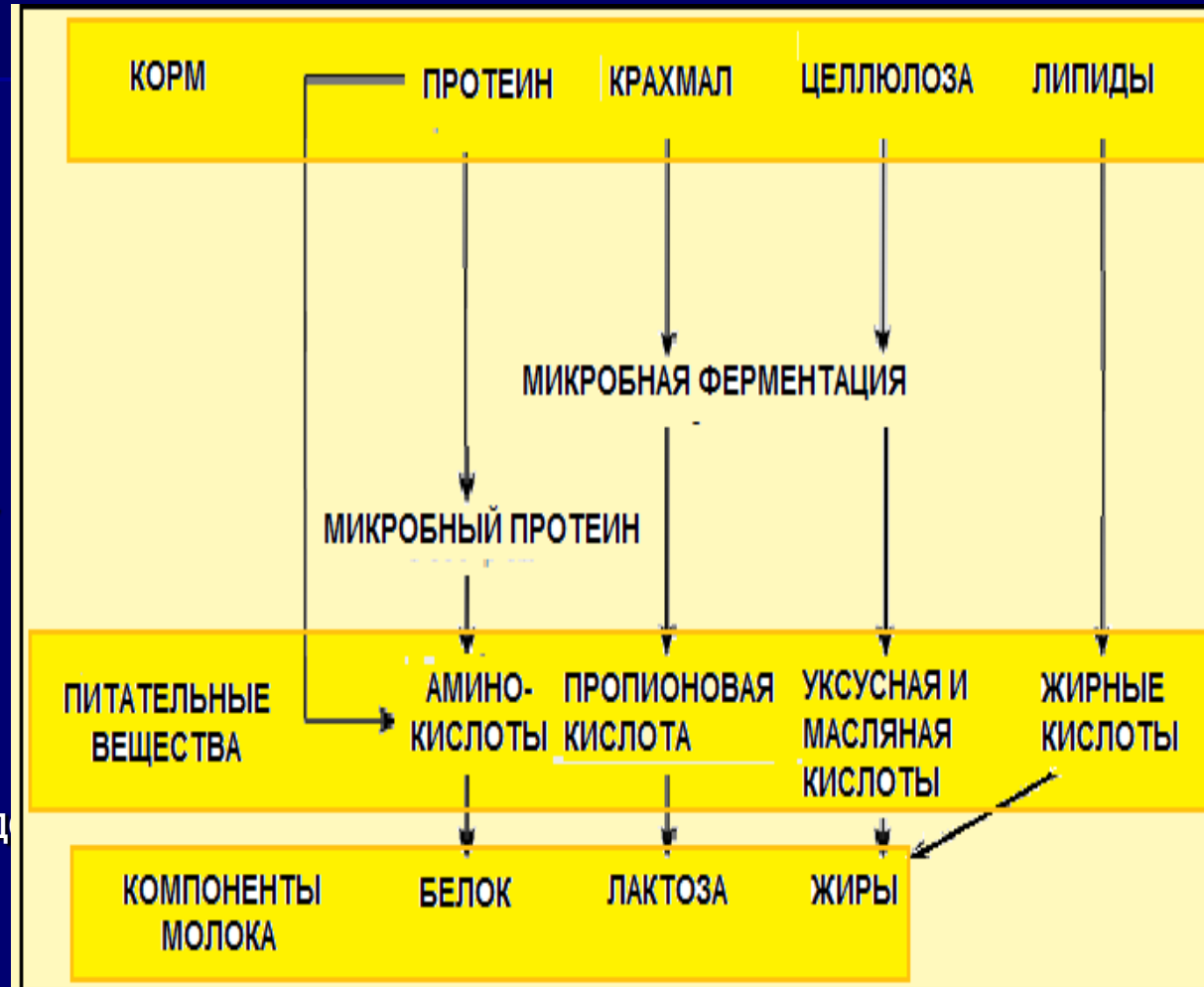
- летучие жирные кислоты
- аминокислоты
- аммиак
- другие метаболиты

Синтез:

- аминокислот
- белков
- веществ липидной природы,
- витаминов
- антибиотических веществ.

Расщепляется:

- 60% клетчатки
- 95% легкопереваримых углеводов
- 60-80% белков



Некоторые микробиологические процессы в рубце КРС

- ❑ Клетчатка – переваривается на 40-60%
- ❑ Клетчатка → ацетат (50-70 об.%) + пропионовая (17-21 об.%) + масляная (14-20 об.%) + валериановая кислота
- ❑ Выделяются газы: углекислота (65%), метан (27%), азот (7%), водород (0,18%)
- ❑ лактат → пропионовая к-та + ацетат + водород + углекислый газ (*Veillonella alcalescens*)

- Анаэробные грибы рубца – интересная группа микрофлоры рубца, составляют по массе 8% от микробной биомассы и активно колонизируют клеточные стенки перевариваемых растений
- Активно прикрепляются к поверхности растительной биомассы в отличие от других микроорганизмов рубца

Стадии развития анаэробного гриба

а – монофлагелятная зооспора

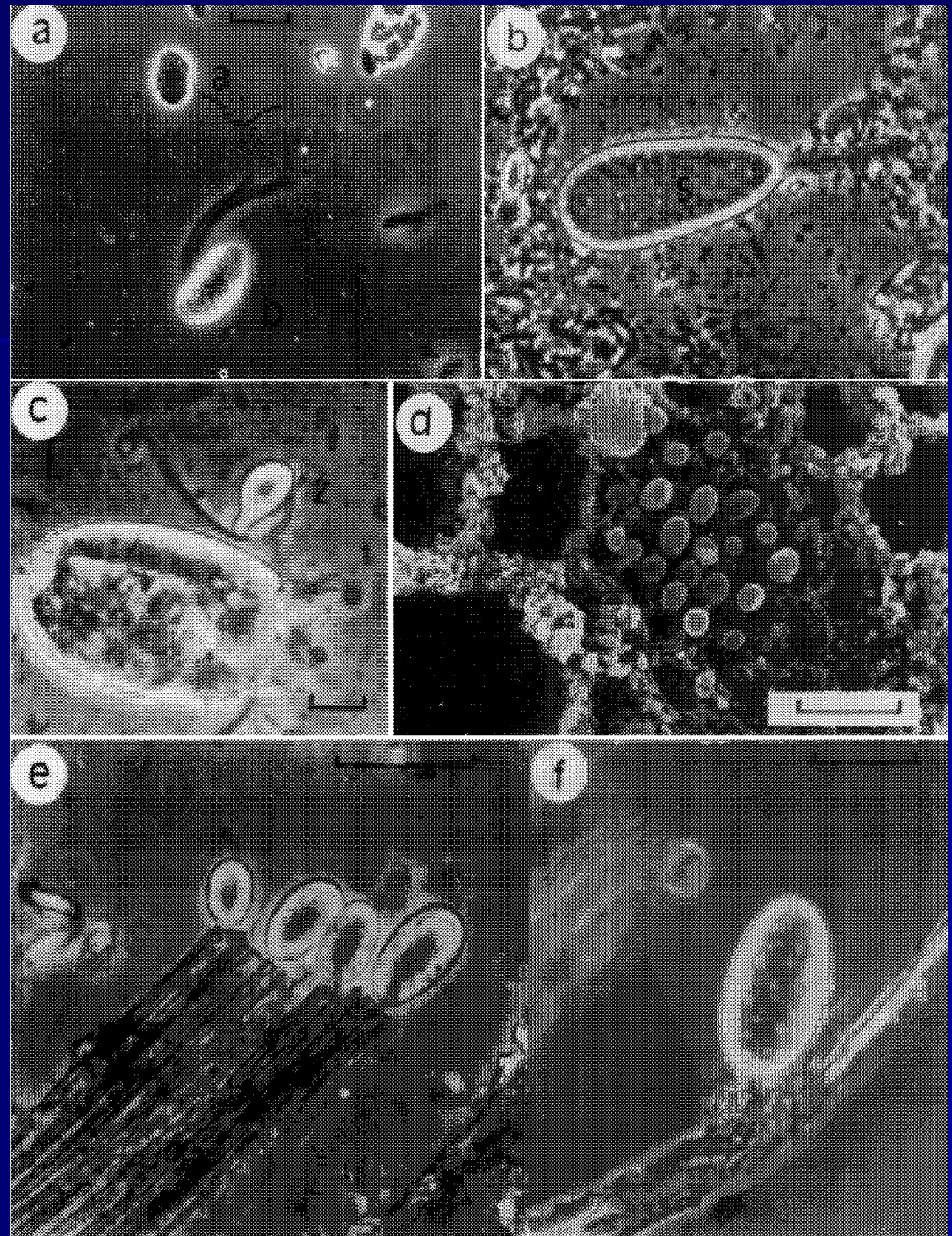
в – полифлагелятная зооспора

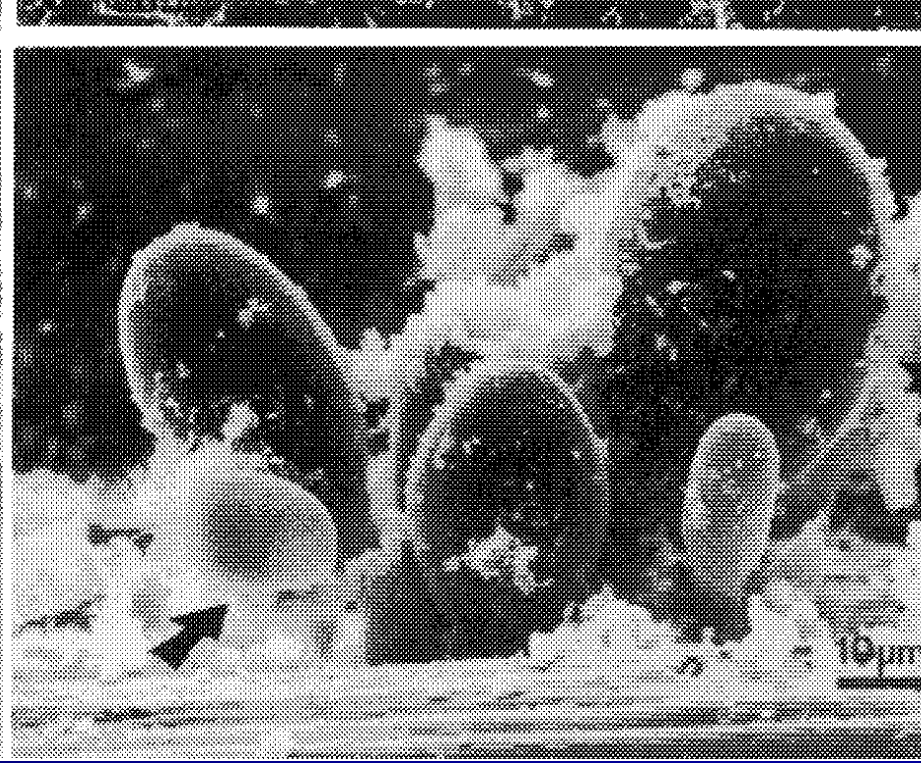
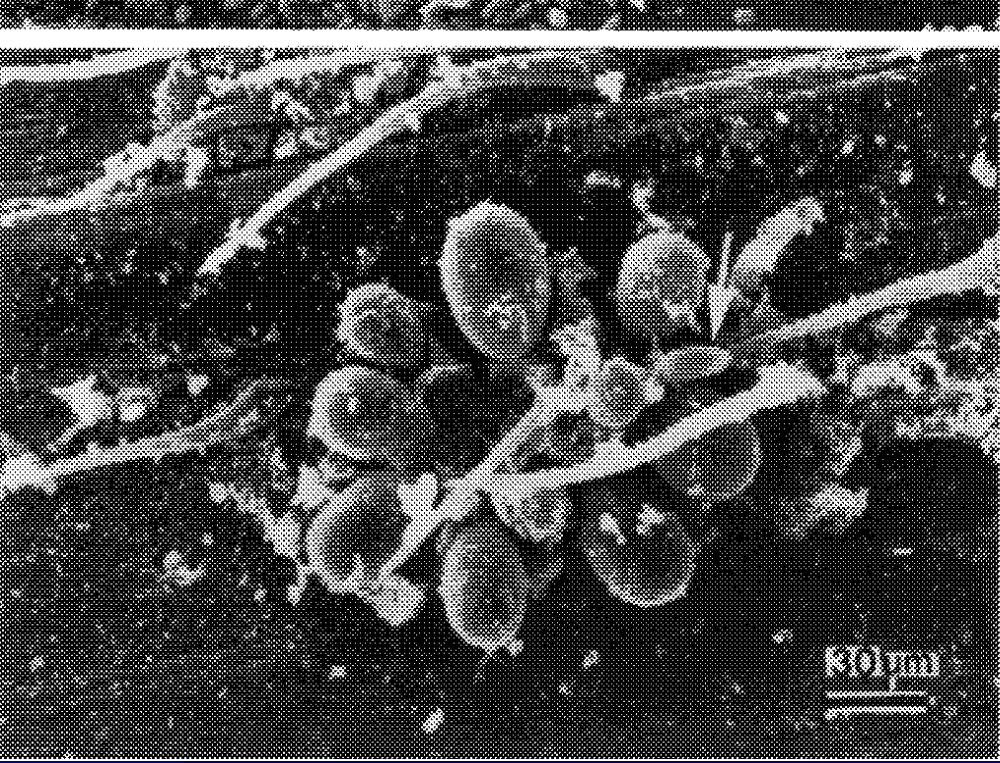
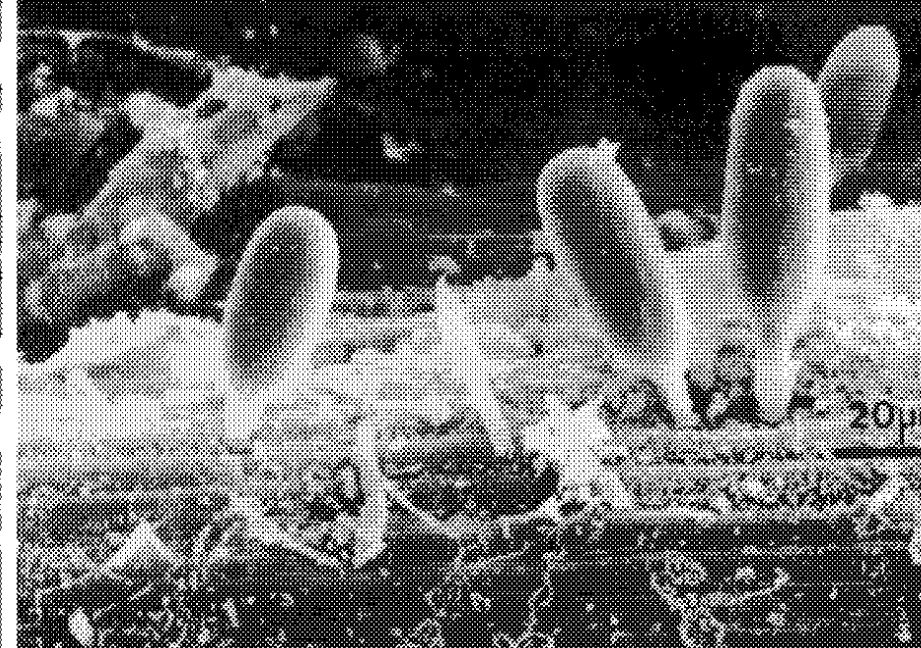
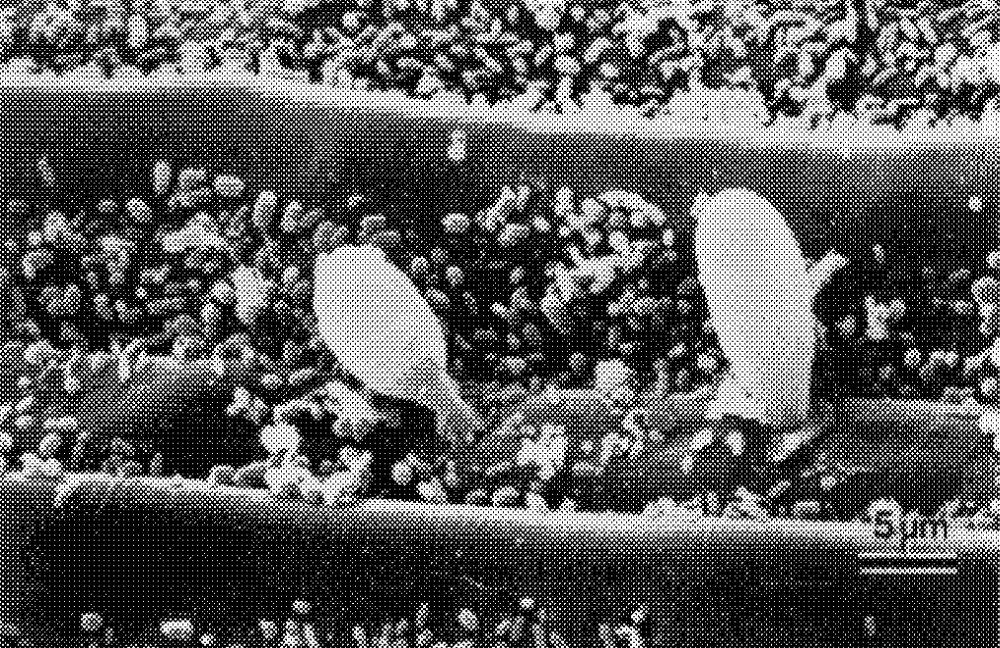
с – полифлагелятная зооспора
рядом с простейшим,

д – прорастающая зооспора на
конечном фрагменте ксилемы
пшеницы

е – таллусы на листе пшеницы

ф – вегетативная стадия на листе
ячменя





Анаэробные грибы рубца

- Обнаружены в 1910 г., но поначалу их считали простейшими (жгутиконосцы)

(Liebetanz et al, 1910; Braune et al, 1913)

- Было обнаружено наличие хитина в клетках, что подтвердило их принадлежность к грибам. Описан вид *Neocallimastix frontalis*

(Orpin, 1975)

- Идентифицированы как анаэробные грибы из рубца овцы, так как у них обнаружены, наряду с подвижной стадией (зооспоры)

существование неподвижной – ризомицелия со спорангиями.

(Orpin, 1975)

- **Ризоиды вегетативного таллуса проникают в ткани растений эффективнее, чем бактерии и простейшие**
- **Этим они оказывают помощь другим микроорганизмам рубца, облегчая процесс проникновения**
- **Более полная и более успешная деградация перевариваемого материала обеспечивается эффективными гидролитическими ферментами**
- **Перспективы их использования для оптимизации процессов пищеварения**

- **Обнаружены в рубце и других отделах желудочно-кишечного тракта растительноядных животных**

(Williams et al, 1987; Rezaeian et al, 2004)

- **Играют активную и позитивную роль в переваривании клетчатки вследствие наличия гидролитических ферментов**

(Williams et al, 1987; Samanta et al, 2001; Paul et al, 2003)

(Kamra et al, 2004; Lee et al, 2004; Dey et al, 2004)

- Развитие грибов стимулируется включением в рацион больших количеств клетчатки

(Kamra et al, 2003)

- Грибы прикрепляются преимущественно к наиболее лигнифицированным фрагментам корма

(Akin et al, 1987)

Классификация

- На основе изучения ультраструктуры зооспор анаэробные грибы отнесены к порядку *Spizellomycetales* и семейству *Neocallimasticaceae*
(Barr et al, 1988)
- Это семейство включает в себя три рода *Neocallimastix*, *Piromyces* (ранее *Piromonas*) и *Caecomyces* (ранее *Sphaeromonas*)
(Gold et al, 1988)
- Описаны три полицентрических рода: *Orpinomyces* (Barr et al, 1989), *Anaeromyces* (Breton et al, 1990) and *Cyllamyces* (Ozkose et al, 2001).

Division: Eumycota
Subdivision: Mastigomycotina
Class: Chytridiomycetes
Order: Spizellomycetales
Family: Neocallimasticaceae
Genera: Monocentric:

Caecomyces: зооспоры с одним или двумя жгутиками; таллус с гдобулярными ризоидами

Neocallimastix: зооспоры с 4-12 жгутиками; таллус с трубчатыми разветвленными ризоидами

Piromyces: зооспоры с 1-4 жгутиками; таллус с трубчатыми разветвленными ризоидами

Polycentric:

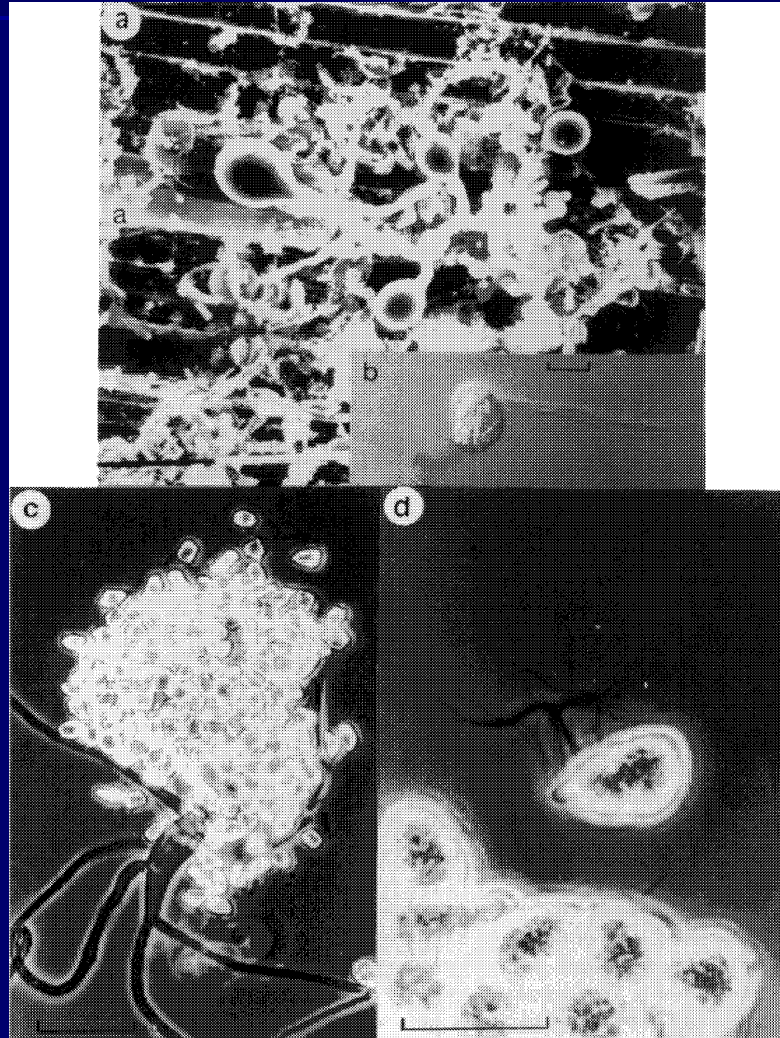
Orpinomyces: многожгутиковые зооспоры

Anaeromyces: зооспора с одним жгутиком

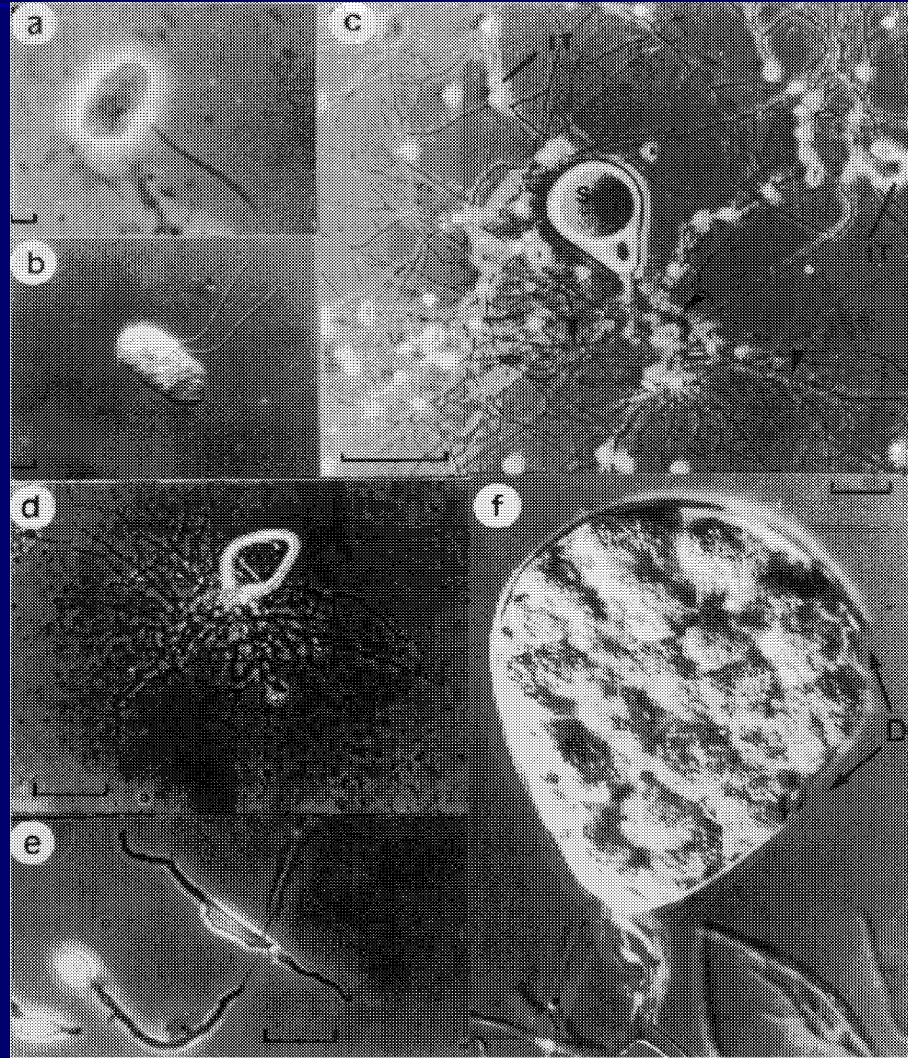
Cyllumyces: : зооспора с 1-2 жгутиками, таллоид с разветвленным спорангиофором

| Genus | Species | Source(s) | Reference(s) |
|-----------------------|--|------------------|---|
| <i>Caecomyces</i> | <i>C. communis</i> , <i>C. equi</i> | Овца Лошадь | <i>Gold et al, 1988</i> <i>Gold et al, 1988</i> |
| <i>Piromyces</i> | <i>P. Communis</i> | Овца Корова | <i>Gold et al, 1988</i> <i>Julliand et al, 1998</i> |
| | <i>P. mae</i> | Лошадь | <i>Li et al, 1990</i> |
| | <i>P. dumbonica</i> | Слон | <i>Li et al, 1990</i> |
| | <i>P. rhizinflata</i> | Осел | <i>Breton et al, 1991</i> |
| | <i>P. Minutus</i> | Олень | <i>Ho et al, 1993</i> |
| | <i>P. Spiralis</i> | Коза | <i>Ho et al, 1993</i> |
| | <i>P. citronii</i> | Лошадь Осел | <i>Gaillard-Martinie et al, 1995</i> <i>Julliand et al, 1998</i> |
| <i>Neocallimastix</i> | <i>N. frontalis</i> | Корова | <i>Heath et al, 1983</i> |
| | <i>N. patriciarum</i> | Овца | <i>Orpin and Munn, 1986</i> |
| | <i>N. hurleyensis</i> | Овца | <i>Webb and Theodorou, 1991</i> |
| | <i>N. variabilis</i> | Овца | <i>Ho et al, 1993</i> |
| <i>Anaeromyces</i> | <i>A. elegans</i> | Корова | <i>Ho et al, 1993</i> |
| | <i>A. mucronatus</i> | Корова | <i>Breton et al, 1990</i> |
| <i>Orpinomyces</i> | <i>O. joyonii</i> | Овца | <i>Breton et al, 1989</i> |
| | <i>O. intercalaris</i> | Корова | <i>Ho et al, 1994</i> |
| <i>Cyllamyces</i> | <i>C. aberensis</i> | Корова | <i>Ozkose et al, 2001</i> |

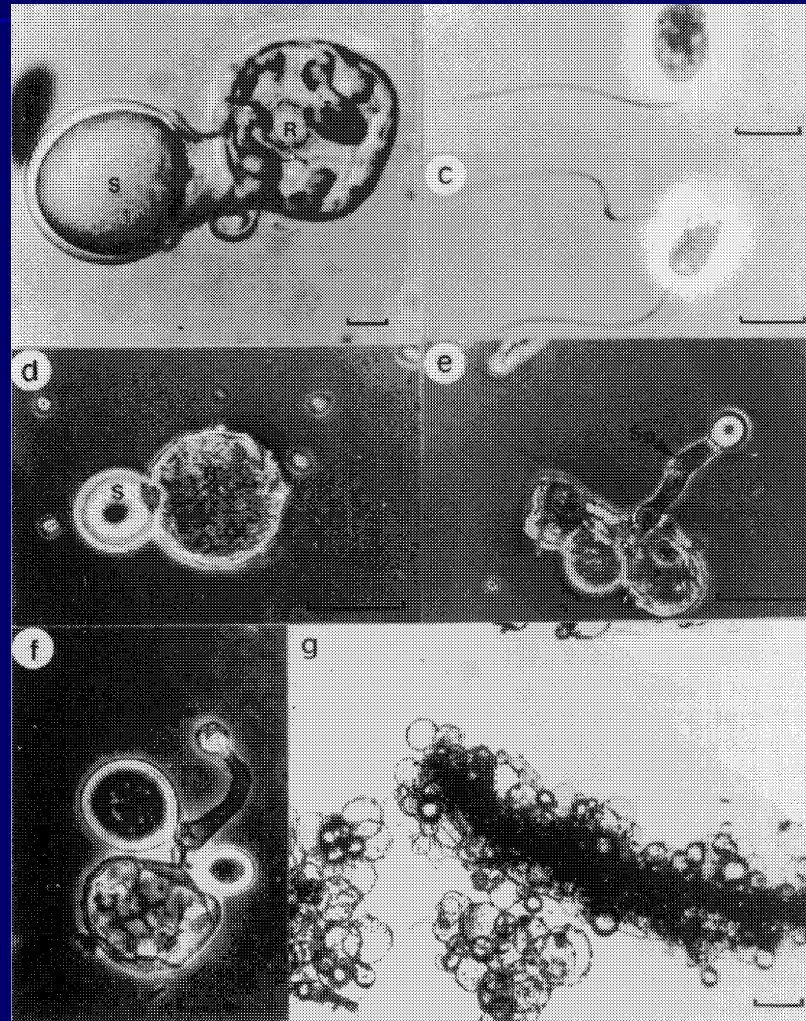
Полицентрический *Orrinomyces joyonii*



Стадии жизненного цикла *Pyromyces communis*



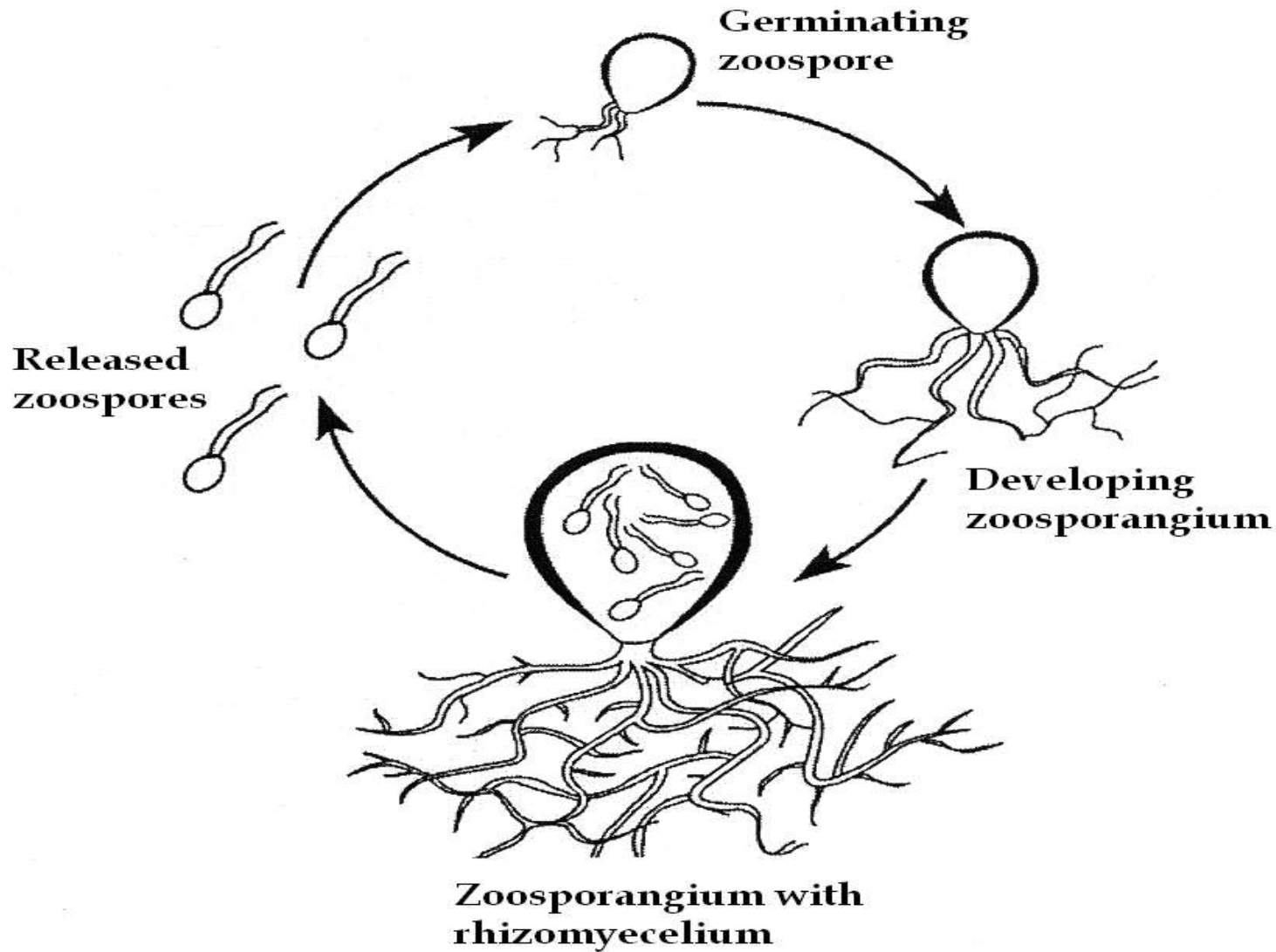
Caecomyces (=Sphaeromyces)
communis в рубце овцы



Жизненный цикл

- **Жизненный цикл длится 23-32 часа**
(Joblin 1981; Bauchop 1983; Lowe *et al.*, 1987)
- **Жизненный цикл моноцентричных грибов заключается в переходе от подвижной зооспоры к неподвижной вегетативной стадии зооспорангия**
- **Зооспора с жгутиком выходит из зооспорангия и образует цисту, теряя жгутик.**
- **Циста прорастает, образуя трубочки, которые в дальнейшем превращаются в ризоиды**

(Orpin *et al.*, 1977)



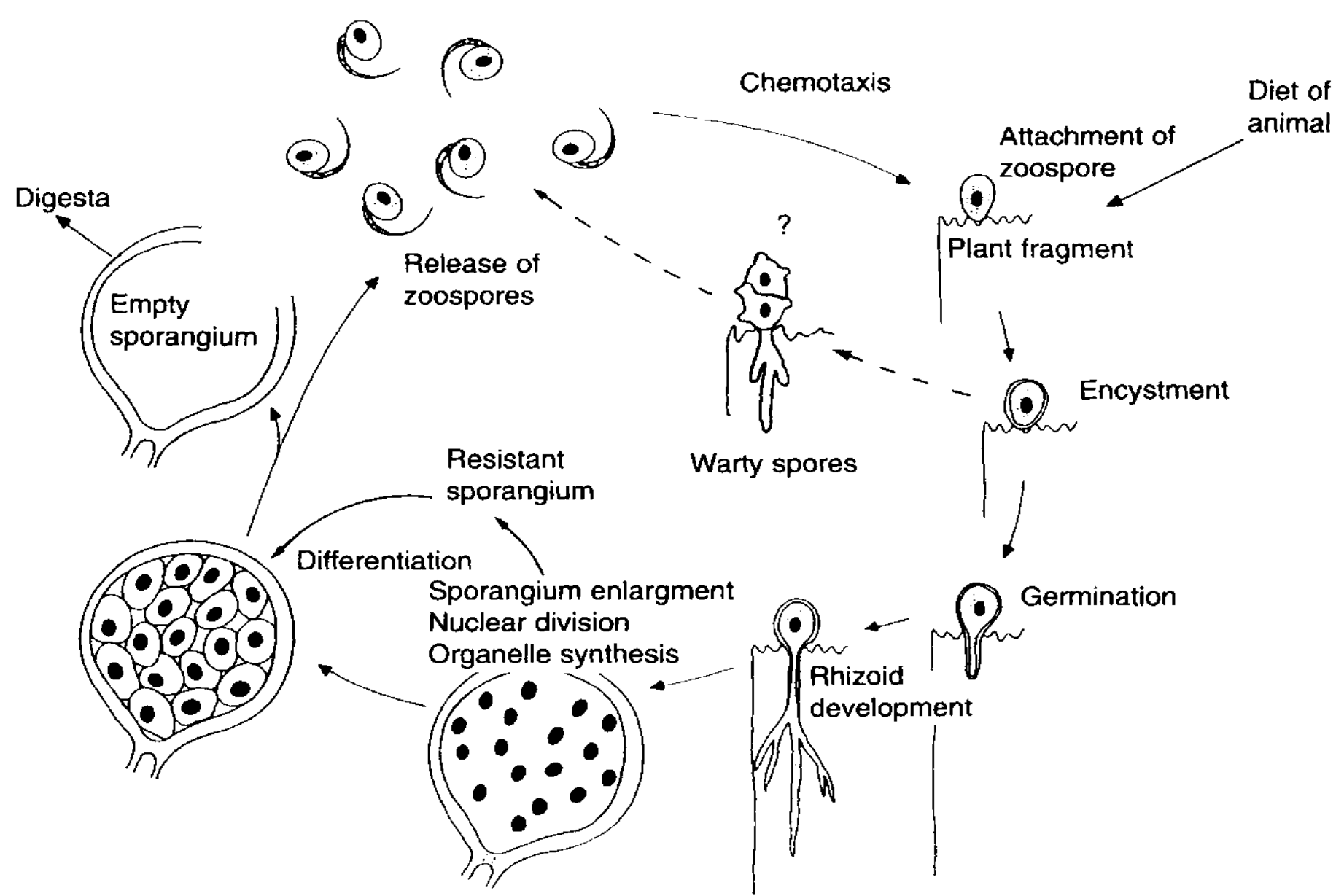
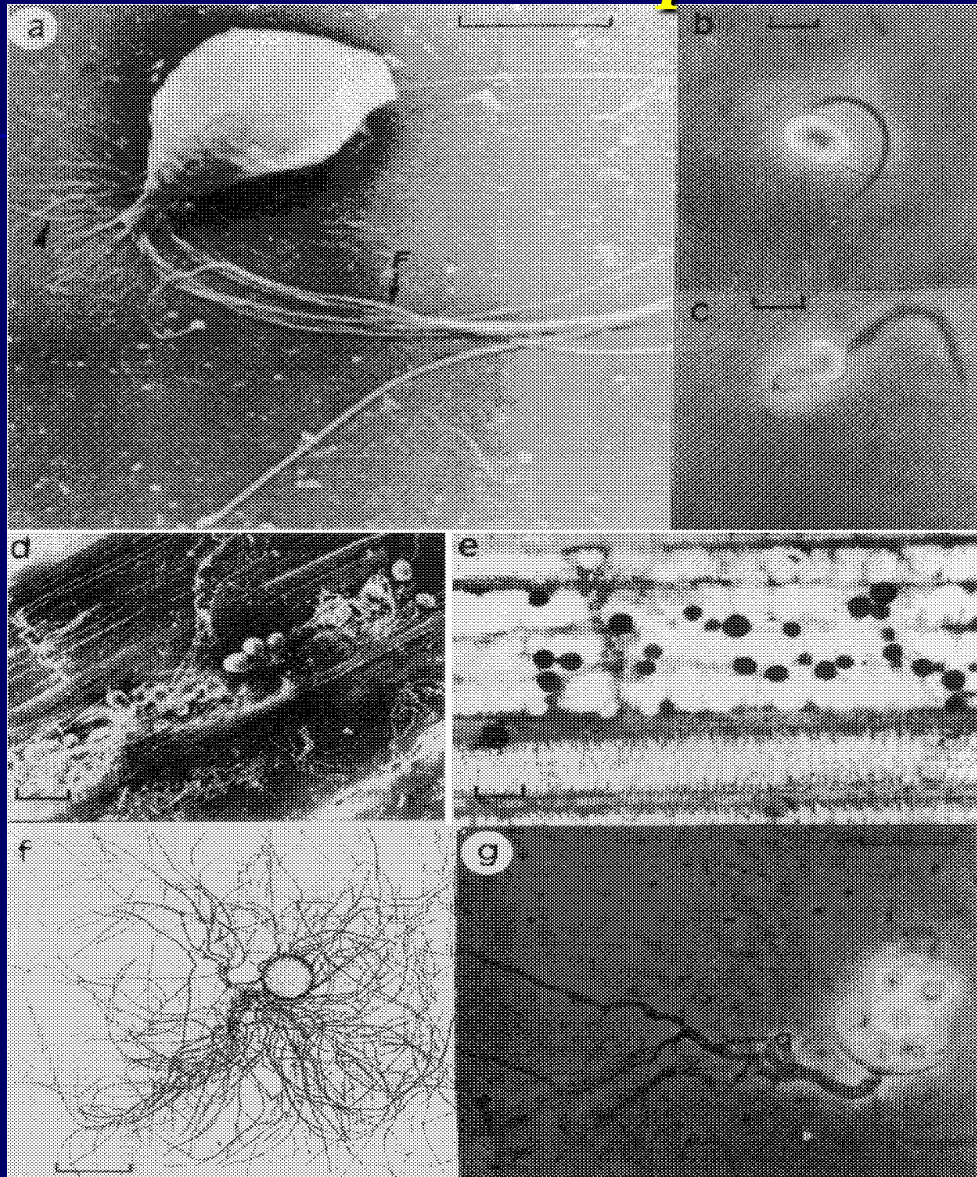


Figure 4.3 Schematic life cycle of monocentric species of anaerobic fungi.

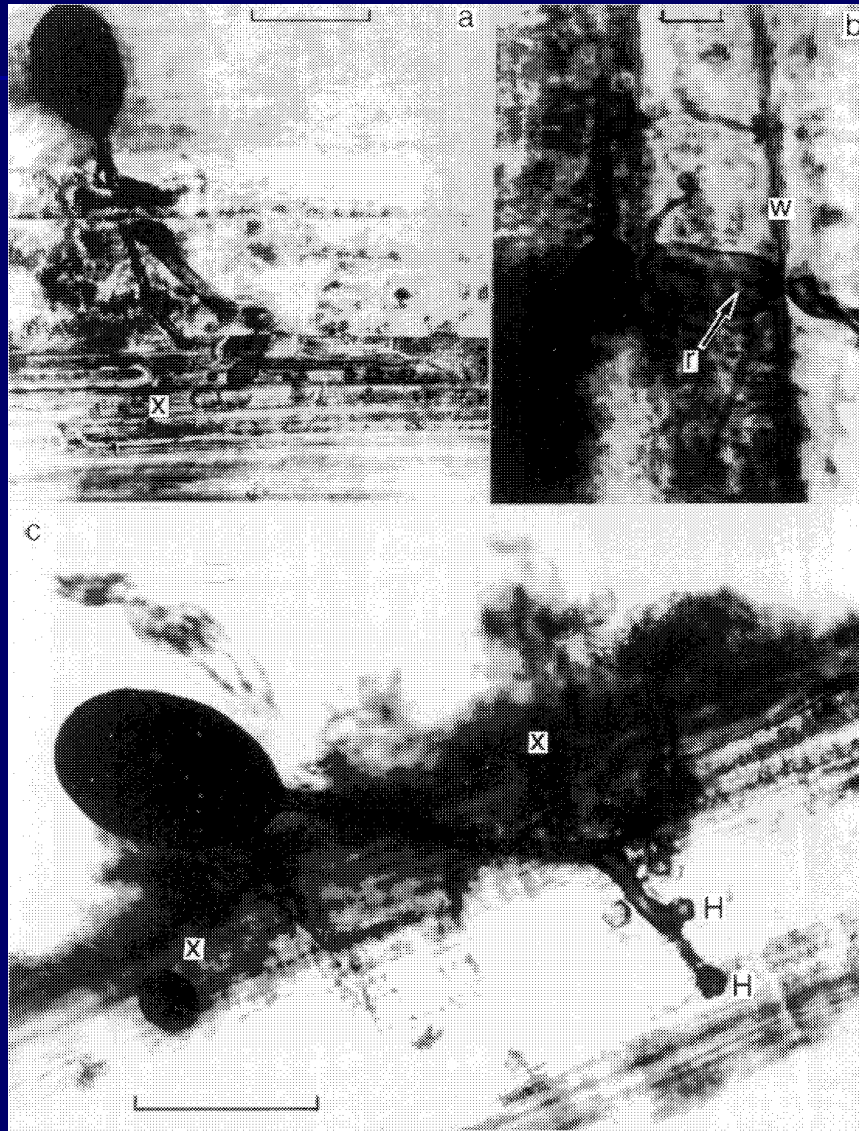
contd...

- Развитие зооспоры из молодого спорангия может происходить за 8 часов после образования цисты при оптимальных условиях. (Orpin et al, 1977)
- Полицентрические грибы не имеют жестко детерминированного цикла и образование зооспор не является обязательной для выживания стадией.
(Ho & Bauchop, 1991)
- У полицентрических грибов зооспоры образуются редко или вообще эта стадия отсутствует
(Phillip et al, 1989)

Стадии жизненного цикла *Neocallimastix patriciarum*



Рост *Neocallimastix patriciarum* на листьях однолетнего райграсса



Распространение

- **Впервые выделены в Великобритании из рубца овцы**

(Orpin, 1975)

- **Обнаружены на всех континентах и всех географических зонах**

- **Распространены среди всех жвачных (коровы, козы, буйволы)**

(Singhal et al, 2000; Dey et al, 2004; Thareja et al, 2006)

contd...

- **Красный олень и импала**

(Bauchop et al, 1979; Singhal et al, 2000)

- **Серый кенгуру, хокер и болотный валлаби**

(Breton et al, 1989)

- **Осел, лошадь, слон, зебра**

(Breton et al, 1990; Li et al, 1990)

Выделение

- Путем высева на расплавленный полумягкий агар с простерилизованной рубцовой жидкостью

(Orpin, 1975)

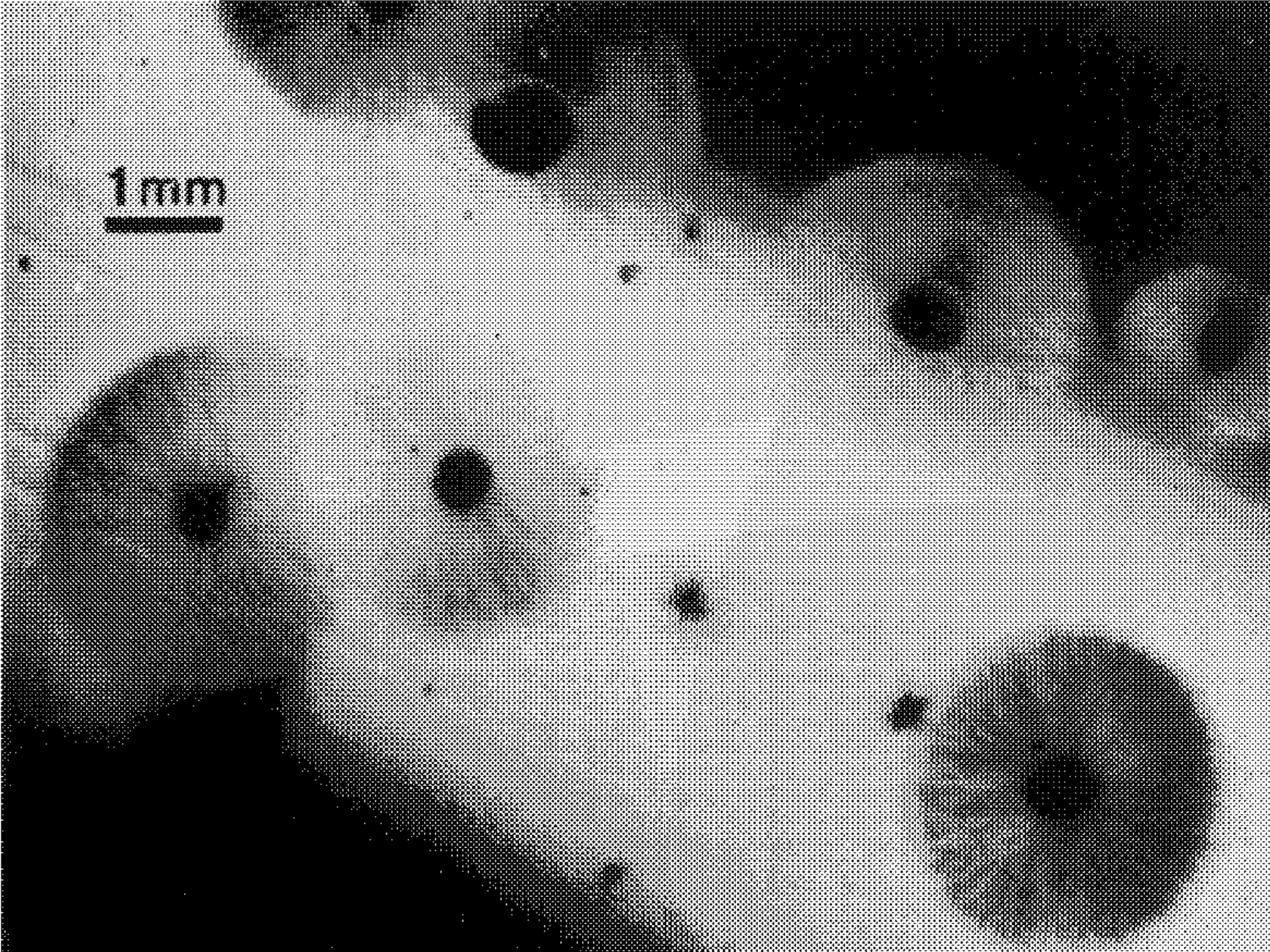
- На чашки Петри для грибов рубца овцы и КРС с рубцовой жидкостью (Lowe et al, 1985)

- Техника «Roll-bottle» (вращающихся пробирок) на полумягкий агар

(Joblin, 1981)

Penicillin, Streptomycin, Neomycin and Chloramphenicol добавляют, чтобы предотвратить рост бактерий

1mm



Идентификация

Идентификация до рода:

- Количество жгутиков на зооспоре
- Ризомицелий
- Форма спорангия

(Breton et al, 1990; Asao et al, 1993)

contd...

- **Определение до вида основано на изучении ультраструктуры зооспор**

(Ho & Barr, 1995)

- **18 видов из 6 родов**

- **Идентификация до вида по PCR-amplification и секвенированию *ITS1* и *ITS2***

(Brookman et al, 2000; Fliegerova et al, 2004)

Подсчет численности

- По количеству индивидуальных зооспор и зооспорангиев в популяциях *in vitro* и *in vivo*

(Joblin, 1981; Ushida et al, 1989)

- По количеству КОЕ на 1 г сухой массы для (feces) для *Piromyces*.

(Breton et al, 1991)

- Процедура на основе расчета таллус-образующих единиц

(Theodorou et al, 1990)

Роль грибов рубца в переваривании клетчатки

- Роль грибов рубца в переваривании растительной клетчатки изучена достаточно подробно

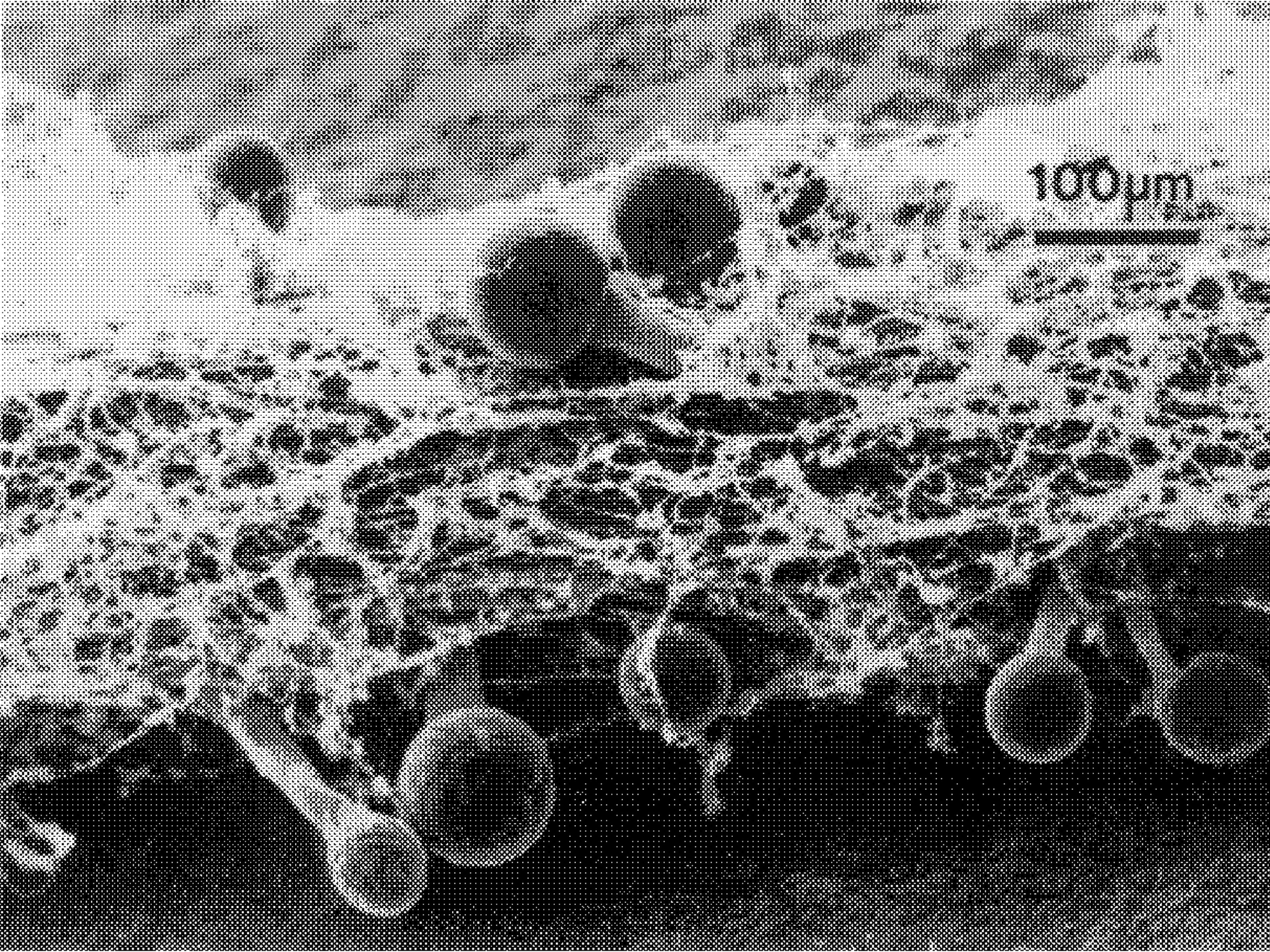
(Lee et al, 2000; 2004; Samanta et al, 2001; Dey et al, 2004, Paul et al, 2004; Thareja et al, 2006; Tripathy et al, 2007)

- Эти грибы лучше проникают в ткани растения, чем бактерии и простейшие

(Orpin and Joblin, 1988)

- Такое проникновение ведет к более быстрому и более полному перевариванию корма

(Bauchop and Mountfort, 1981)



contd...

- **Важной особенностью АГР является разрушение наиболее лигнифицированных клеточных стенок**

(Mountfort et al,

1982; Akin and Benner, 1988)

- **Грибы рубца растворяют небольшое количество фенольных соединений растительной клеточной стенки**

(Orpin, 1983; Gordon et al, 1985)

- **Зооспоры многих видов колонизируют наиболее лигнифицированные участки склеренхимы и ксилемы**

(Akin et al, 1986)

contd...

- Анаэробные грибы проникают через кутикулу – недоступный барьер для других микроорганизмов
- Анаэробные грибы атакуют клеточные стенки, ослабляя их механическую прочность

(Akin et al, 1989, 1990)

Это ослабление механической прочности растительной ткани приводит к увеличению переваримости и поедаемости корма

(Borneman and Akin, 1990)

contd...

- **Обнаружено, что при увеличении численности грибов *Orpinomyces*, *Piromyces* and *Anaeromyces* возрастает переваримость СОЛОМЫ**
(Manikumar et al, 2002; Sehgal et al, 2002; Tripathy et al, 2007)
- **Если овце спаивать культуру моноцентрических грибов, то на 7-12% возрастает поедаемость СОЛОМЫ**
(Gordon and Phillips, 1998)
- **В экспериментах *in vitro* возросло переваривание соломы при добавлении культуры гриба**
(Lee et al, 2004)

■ Деградация клеточных стенок растений
приводит:

- ✓ К расслоению тканей ксилемы
- ✓ Колец склеренхимы в стеблях
- ✓ Кутикулярных тканей в листьях

(Bauchop *et al.*, 1989)

Гидролитические ферменты

- В переваривании клетчатки принимают участие бактерии и простейшие рубца

(Williams, 1988; Akin and Benner, 1988)

- Грибы рубца играют еще большую роль – они переваривают наиболее лигнифицированные фрагменты корма

(Akin et al, 1988)

- Деградация и использование лигнифицированных клеточных стенок растений обеспечивается синтезом большого количества гидролитических ферментов:

- **Целлюлазы**

(Barichievich and Calza, 1990; Yanke et al, 1993; Paul et al, 2004)

- **Гемицеллюлазы**

(Lowe et al, 1987; Mountfort and Asher, 1989)

- **Протеазы**

(Wallace and Joblin, 1985; Michel et al, 1993)

- **Амилазы, амилогликозидазы**

(Mountfort and Asher, 1988; Paul et al, 2004)

contd...

- **Ферулоил- и p-кумарил- эстеразы**

(Borneman et al, 1990; 1991; 1992; Paul et al, 2004)

- **Различные дисахаридазы**

(Hebraud and Fevre, 1988; Chen et al, 1994)

- **Пекетиназы**

(Gordon and Phillips, 1992)

Взаимоотношения с другими микроорганизмами рубца

- Грибы рубца образуют устойчивые ко-культуры с метаногенными бактериями

(Fonty and Joblin, 1991; Orpin and Joblin, 1997)

- В результате такого симбиоза возрастает масса гриба, а также скорость переваривания и количество переваренной клетчатки

(Bernalier *et al*, 1989; 1991; Joblin *et al*, 1989)

- Снижение целлюлозолитической активности при совместном культивировании с целлюлозолитическими руминококками

(Bernalier *et al*, 1992; Roger *et al*, 1993)

Тип взаимодействий?

Точка зрения человека?

- Дикое животное
- Одомашненное животное в крестьянском хозяйстве
- Животное в условиях интенсивного животноводства (точка безубыточности)

Действие *Ruminococcus albus* 1-33 на разложение субстратов популяциями бактерий и грибов рубца

| Вариант опыта | Разложено субстрата в % к массе исходной навески | |
|---|--|-----------|
| | Фильтровальная бумага | Солома |
| Рубцовая жидкость | 26,8±1,15 | 33,3±2,00 |
| Рубцовая жидкость + <i>R. albus</i> 1-33 | 32,6±2,15 | 28,0±4,0 |
| Рубцовая жидкость + пенициллин и стрептомицин | 20,0±0,00 | 28,0±0,00 |
| Рубцовая жидкость + нистатин | 31,0±1,15 | 22,0±2,00 |
| Рубцовая жидкость + нистатин + <i>R. albus</i> 1-33 | 38,4±2,42 | 22,0±2,15 |
| Рубцовая жидкость + пенициллин, стрептомицин и нистатин | 0 | 0 |

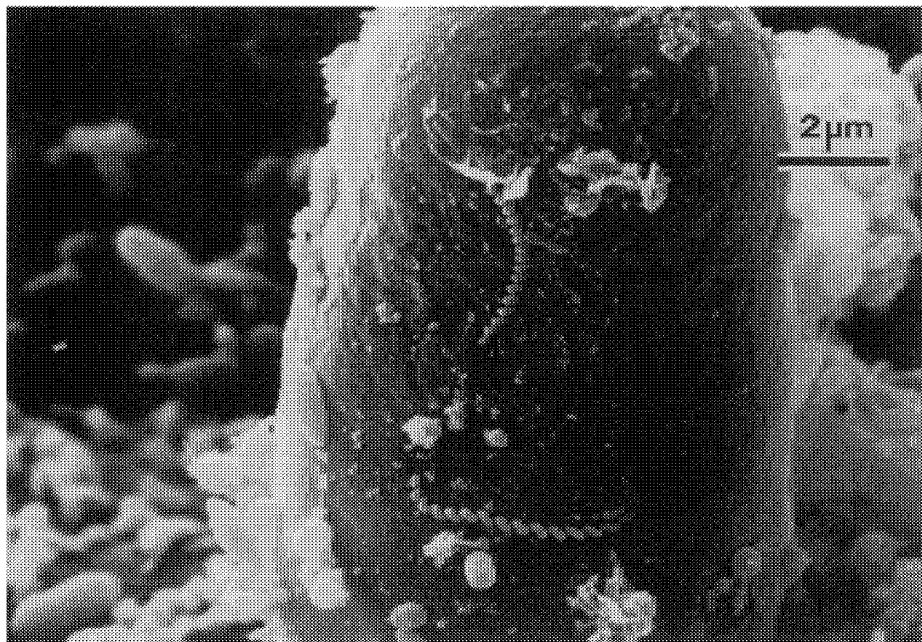
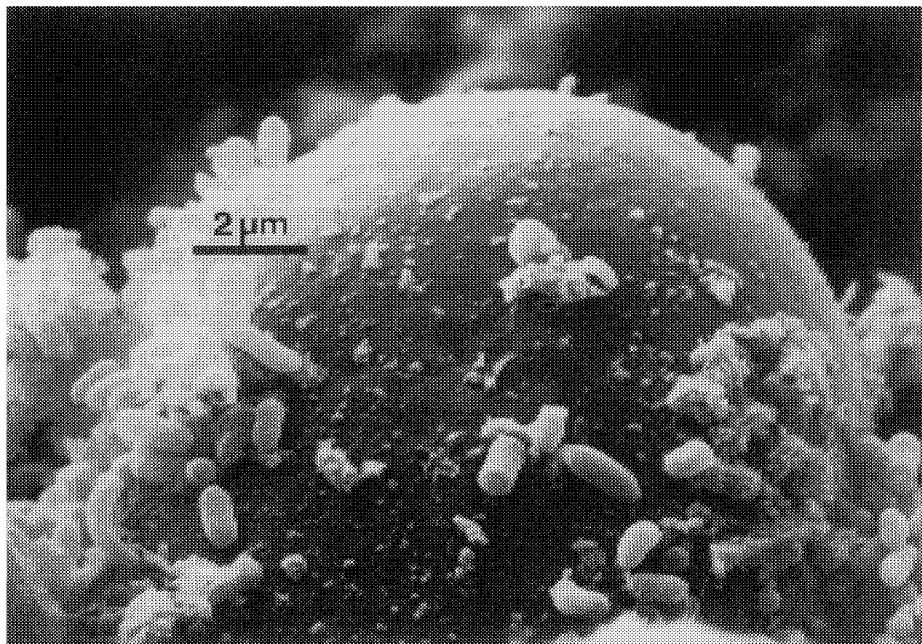


Figure 4.11 Scanning electronmicrograph showing bacteria attached to sporangia of rumen fungi growing on plant particles from the ruminal digesta of a sheep.

- **Рост грибов тормозится при их выращивании в культурах с бактериями**

(Dehority and Tirabasso, 2000)

- **Совместное инкубирование грибов и простейших приводит к поглощению и перевариванию грибов простейшими**

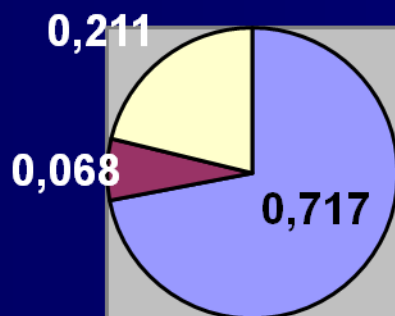
(Orpin and Joblin, 1997)

- **Наличие хитиназной активности у смешанных культур простейших указывает на то, что они выступают в роли хищников по отношению к грибам**

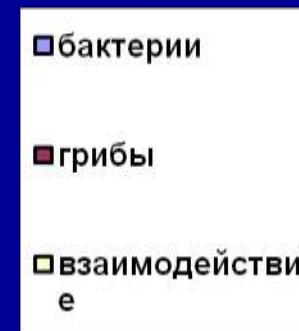
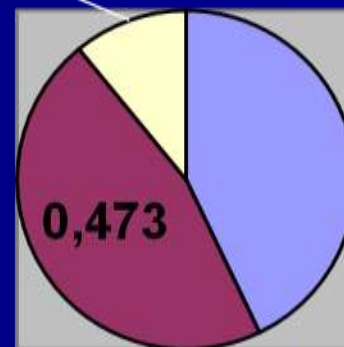
(Joblin, 1990; Williams et al, 1994; Morgavi et al, (1994)

Роль бактерий и грибов рубца в переваривании клетчатки

Фильтровальная бумага



Овсяная солома



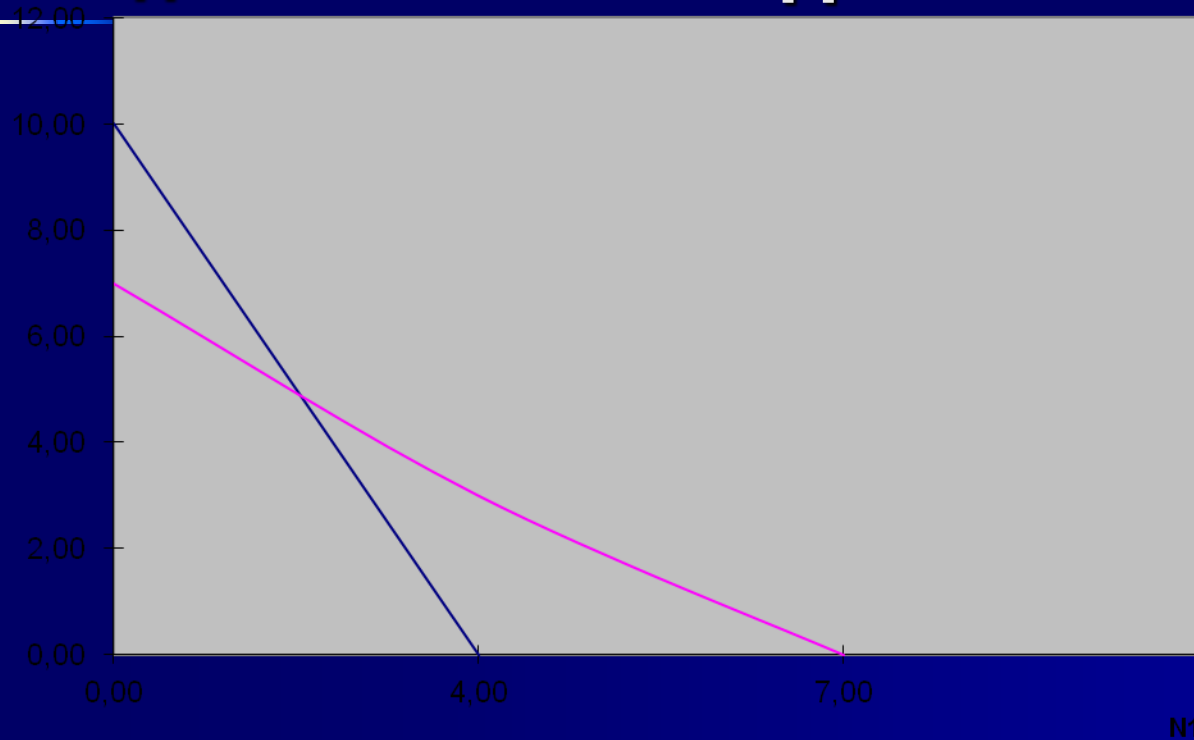
Уравнение Лотки-Вольтерра

$$\begin{aligned} \frac{dN_1}{dt} &= r_1 N_1 \frac{K_1 - N_1 - N_2 \alpha_{12}}{K_1} \\ \frac{dN_2}{dt} &= r_2 N_2 \frac{K_2 - N_2 - N_1 \alpha_{21}}{K_2} \end{aligned}$$

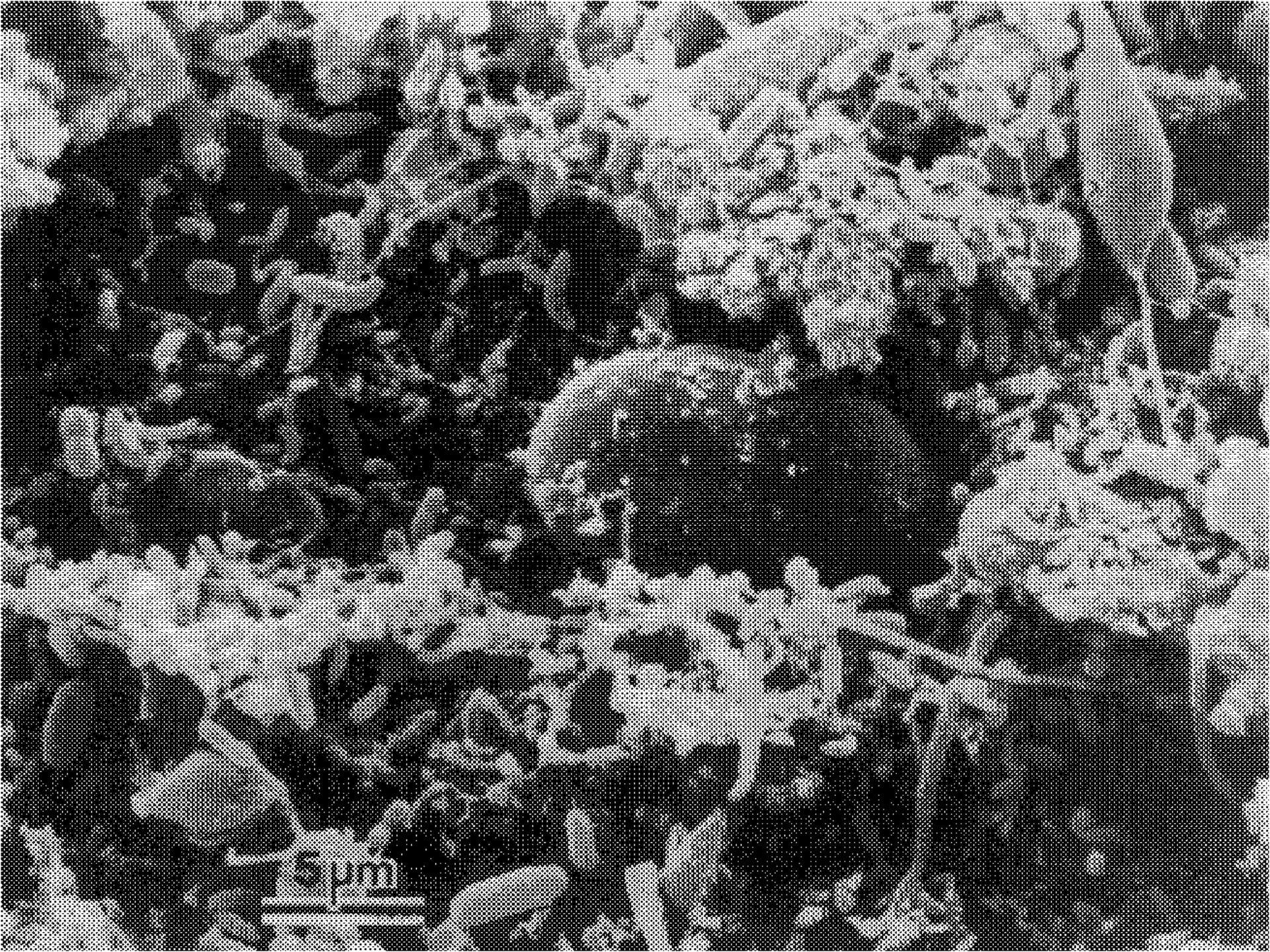
- где N_1 – плотность популяций грибов, N_2 – плотность популяций бактерий, K_1 – плотность насыщения популяции грибов при подавлении бактерий, K_2 – плотность насыщения популяций бактерий при подавлении грибов, r_1 и r_2 – максимальные удельные скорости увеличения популяций, α_{12} – коэффициент конкуренции, характеристика популяции бактерий. Отражающая меру ее конкурентного давления на популяции грибов, α_{21} – аналогичная величина для популяций грибов.

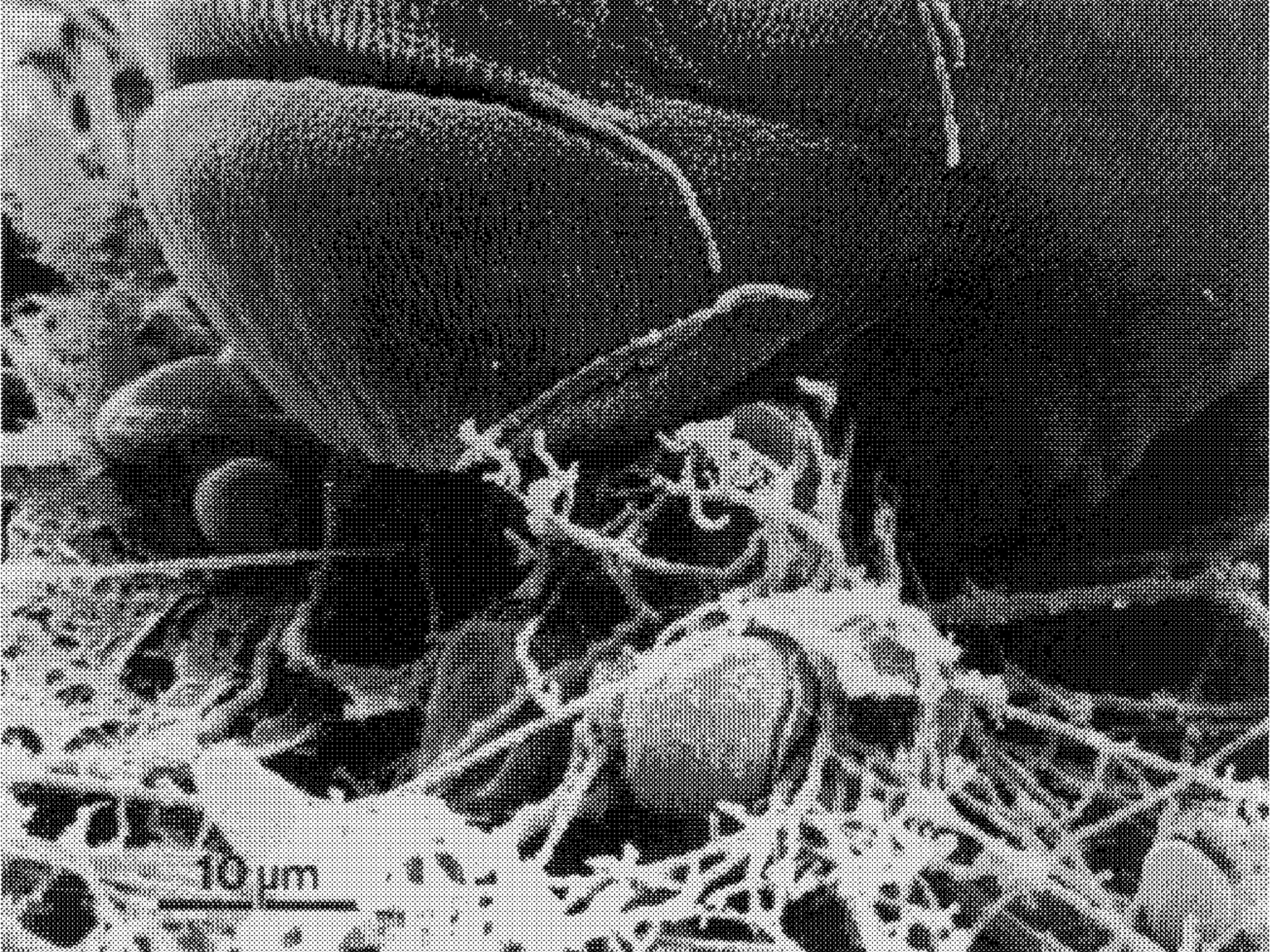
Анализ возможности устойчивого сосуществования популяций грибов и бактерий в содержимом рубца согласно модели Лотки-Вольтерра

N2

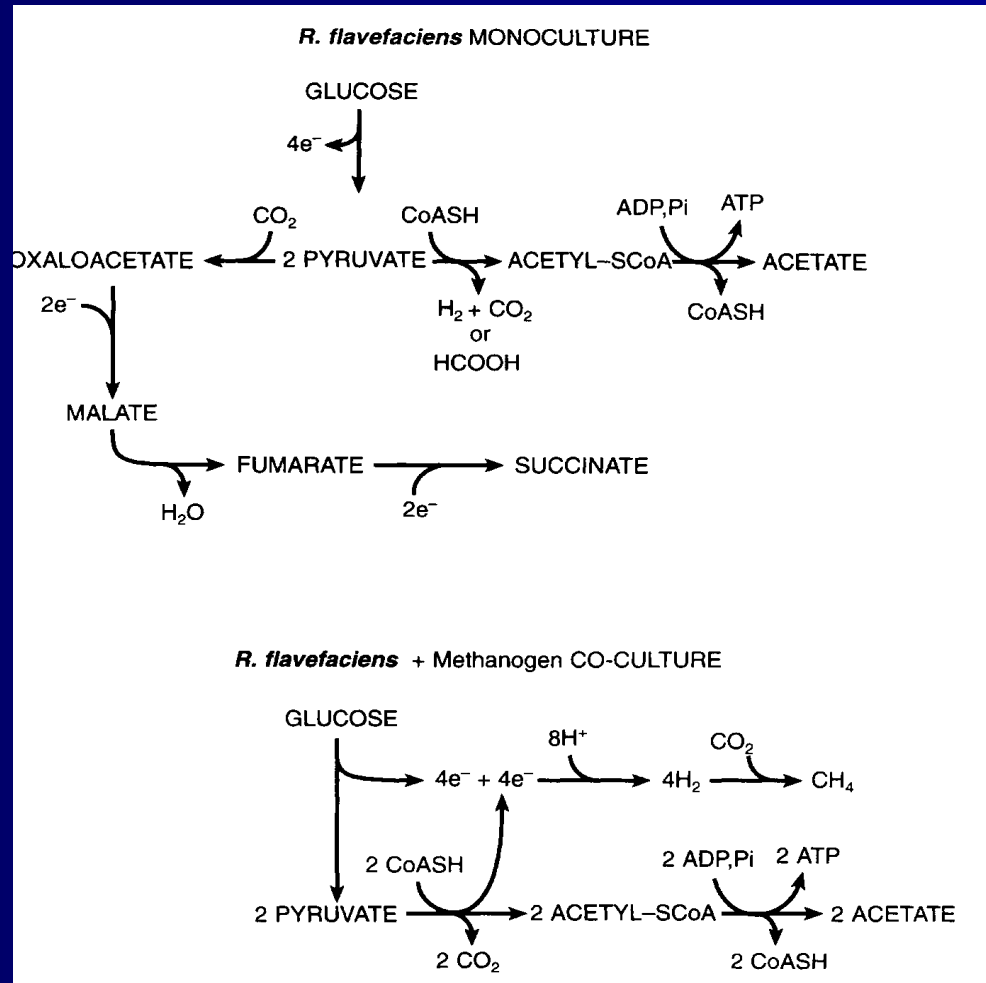


— грибы — бактерии

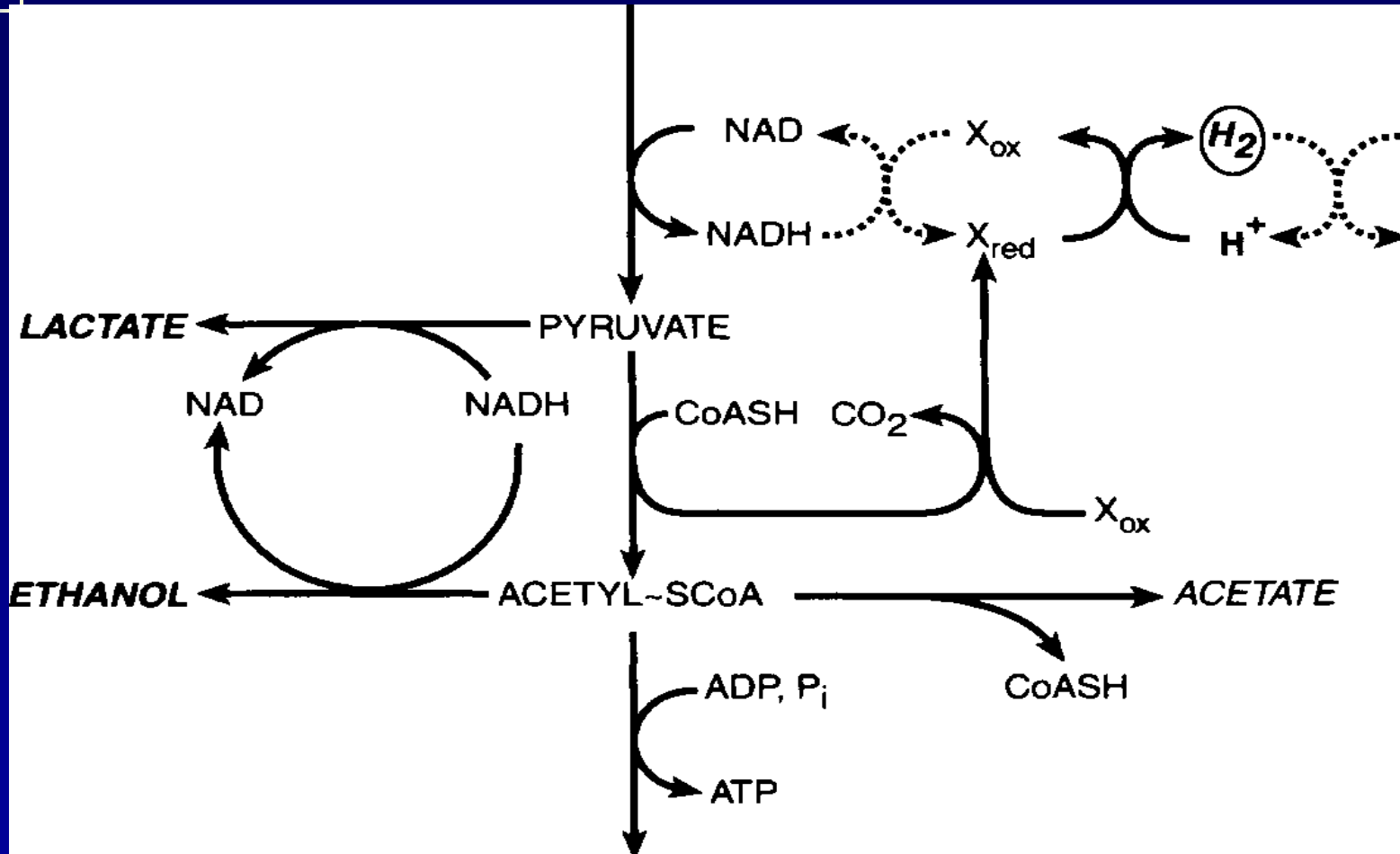




Сбраживание сахаров целлюлозолитической бактерией рубца в чистой культуре и в присутствии метаногенных архей



Сбраживание сахаров анаэробным грибом в присутствии метаногенных архей



Влияние анаэробных грибов рубца на показатели продуктивности

- ❑ Увеличение переваривания клетчатки и других веществ
- ❑ Увеличение поедаемости и усвояемости
- ❑ Увеличение прироста живой массы
- ❑ Увеличение молочной продуктивности

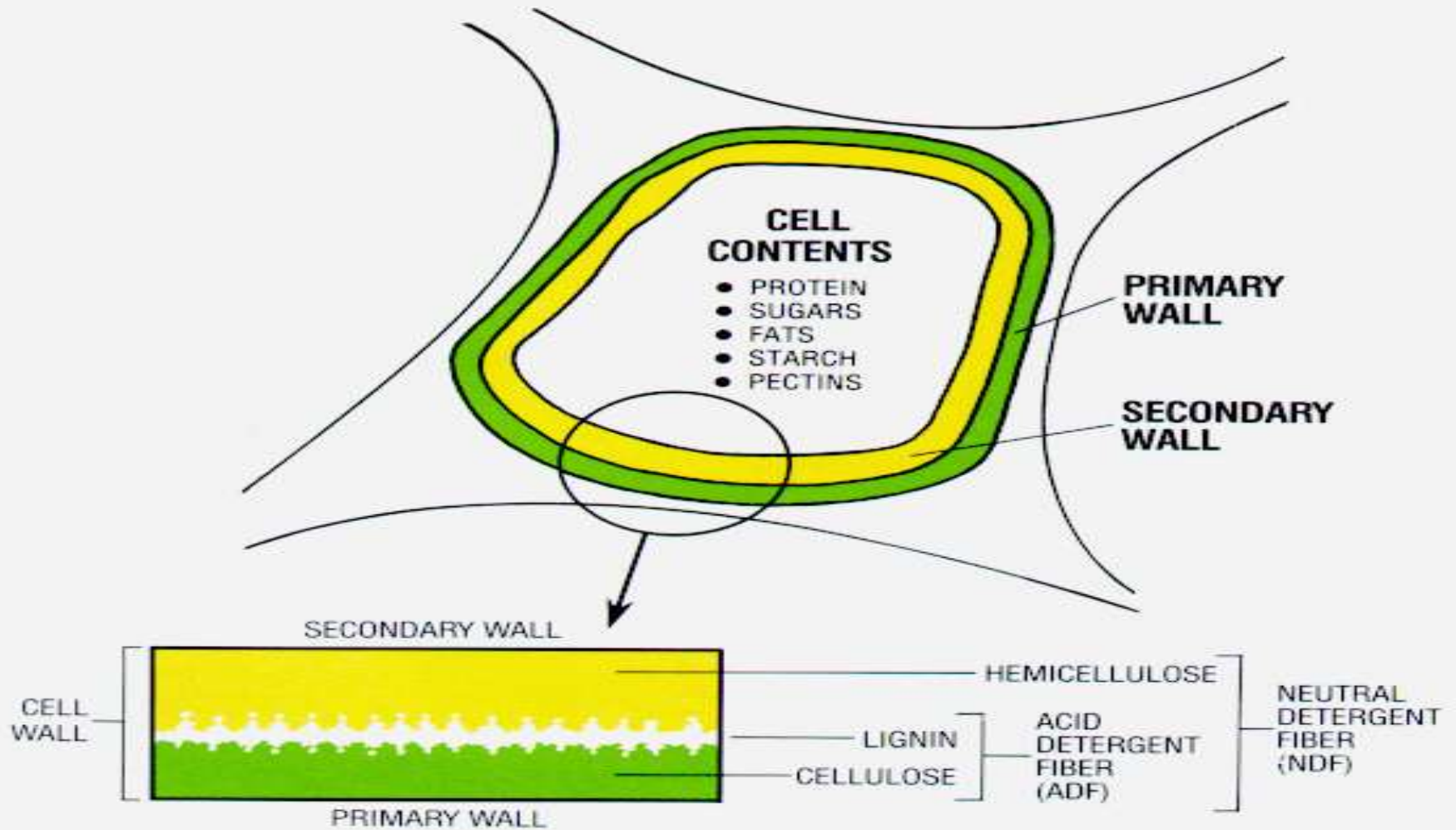
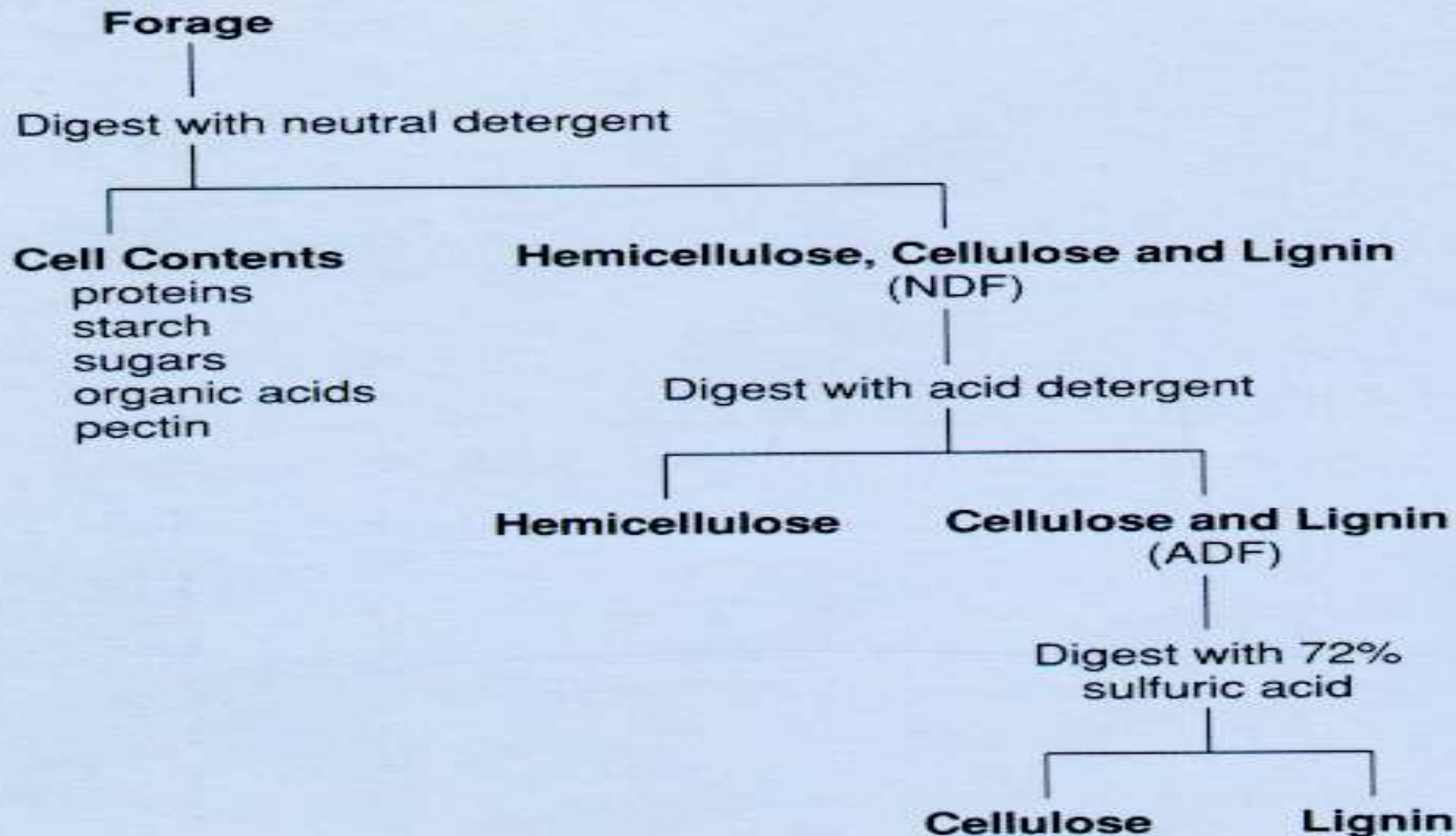
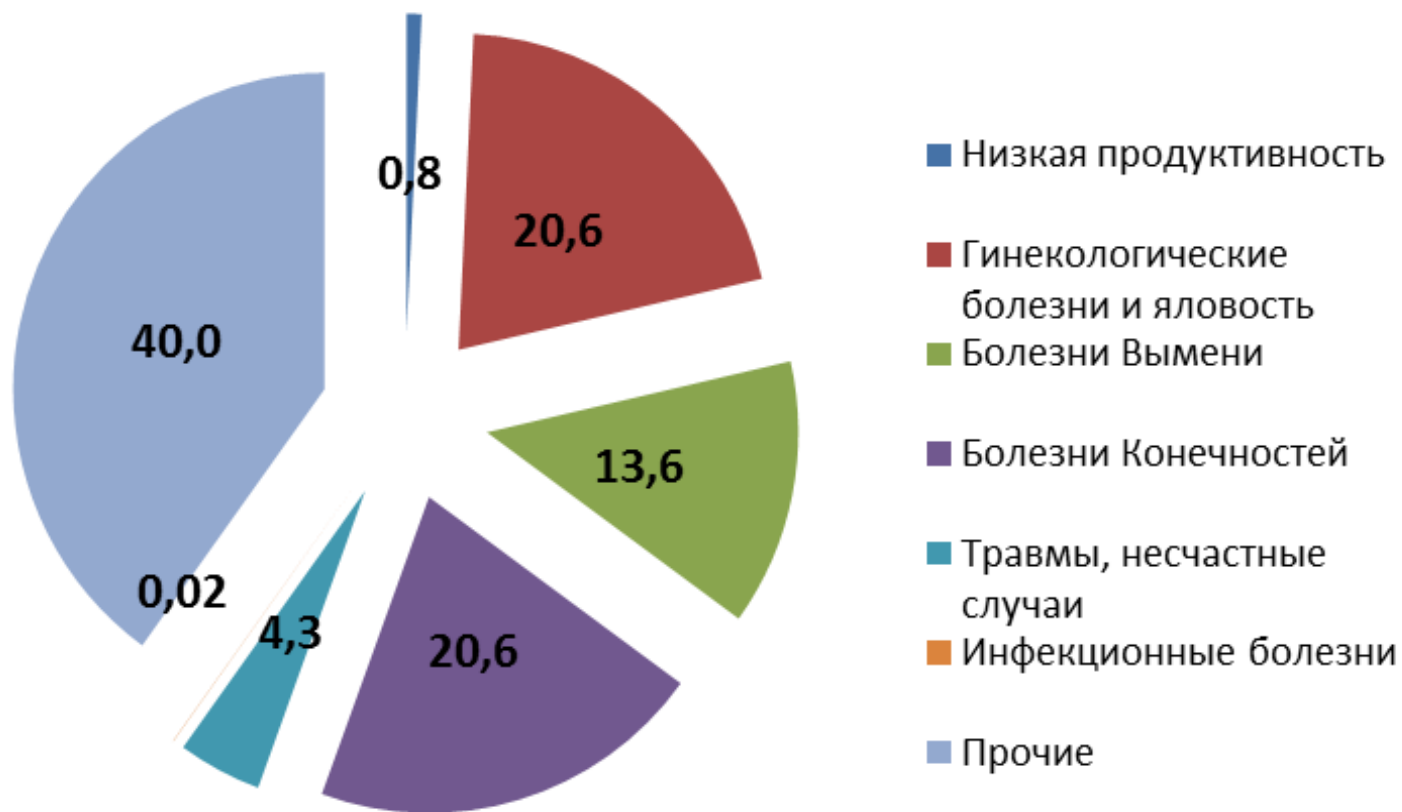


Figure 1. Diagram of a plant cell showing cell wall structure.



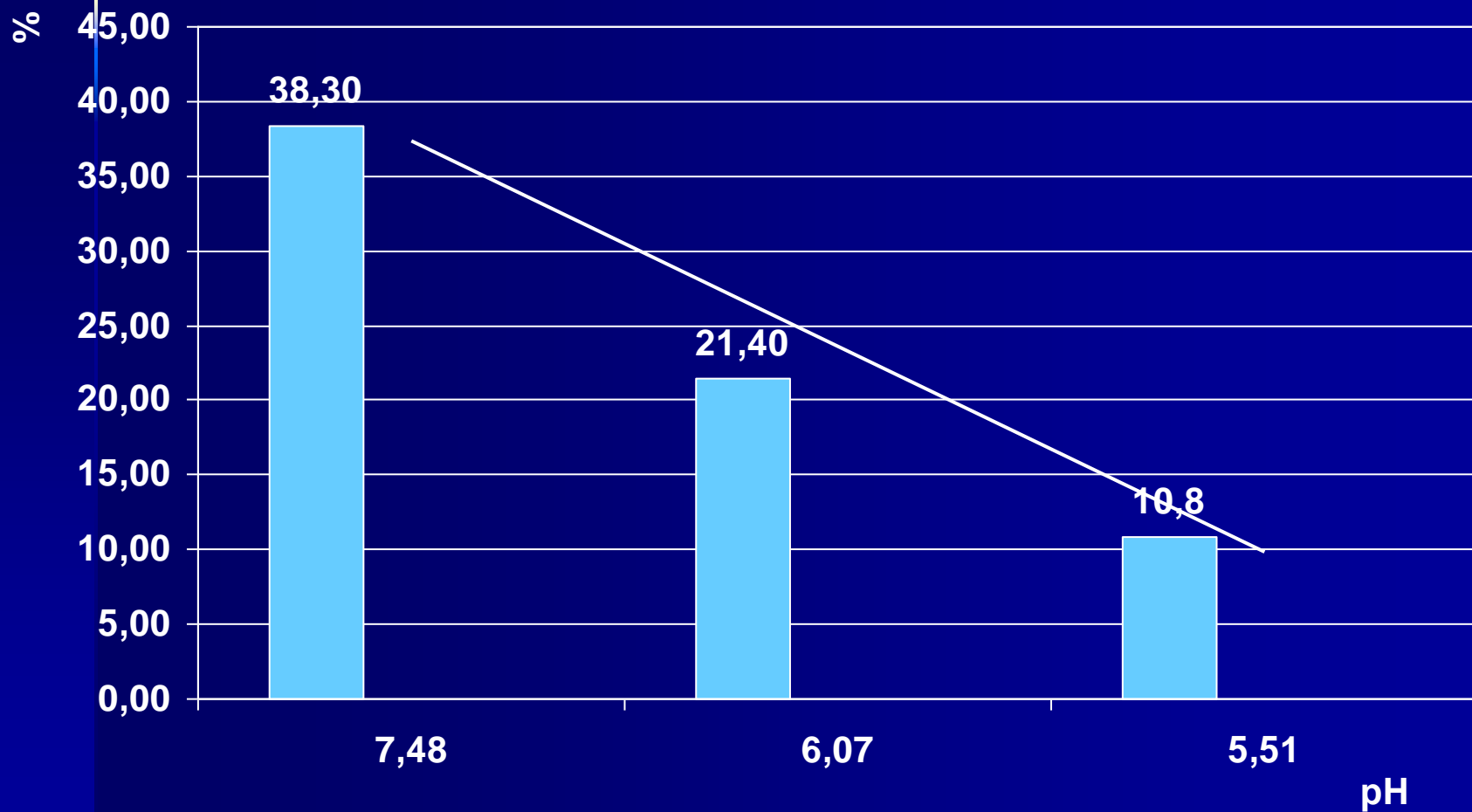
**По каким причинам выбраковывают коров в племенных хозяйствах Ленинградской области
(данные 2013 г. Данные РЦ «Плиноор», Е.Н. Тюренкова)**



Продуктивное хозяйственное использование коров в племенных хозяйствах Ленинградской области в 2013 г.

- Коровы, выбракованные на **первой лактации** и не успевшие окупить затраты на выращивание принесшие для хозяйств **убыток**, составляют **от 18% до 26%** выбракованных животных.
- Коровы, выбракованные на **второй лактации** и **только окупившие** собственные затраты и не принесшие прибыли составляют **от 22% до 25%** выбракованных животных.

Влияние pH на целлюлазную активность содержимого рубца



Влияние pH на целлюлазную активность популяций бактерий и грибов рубца

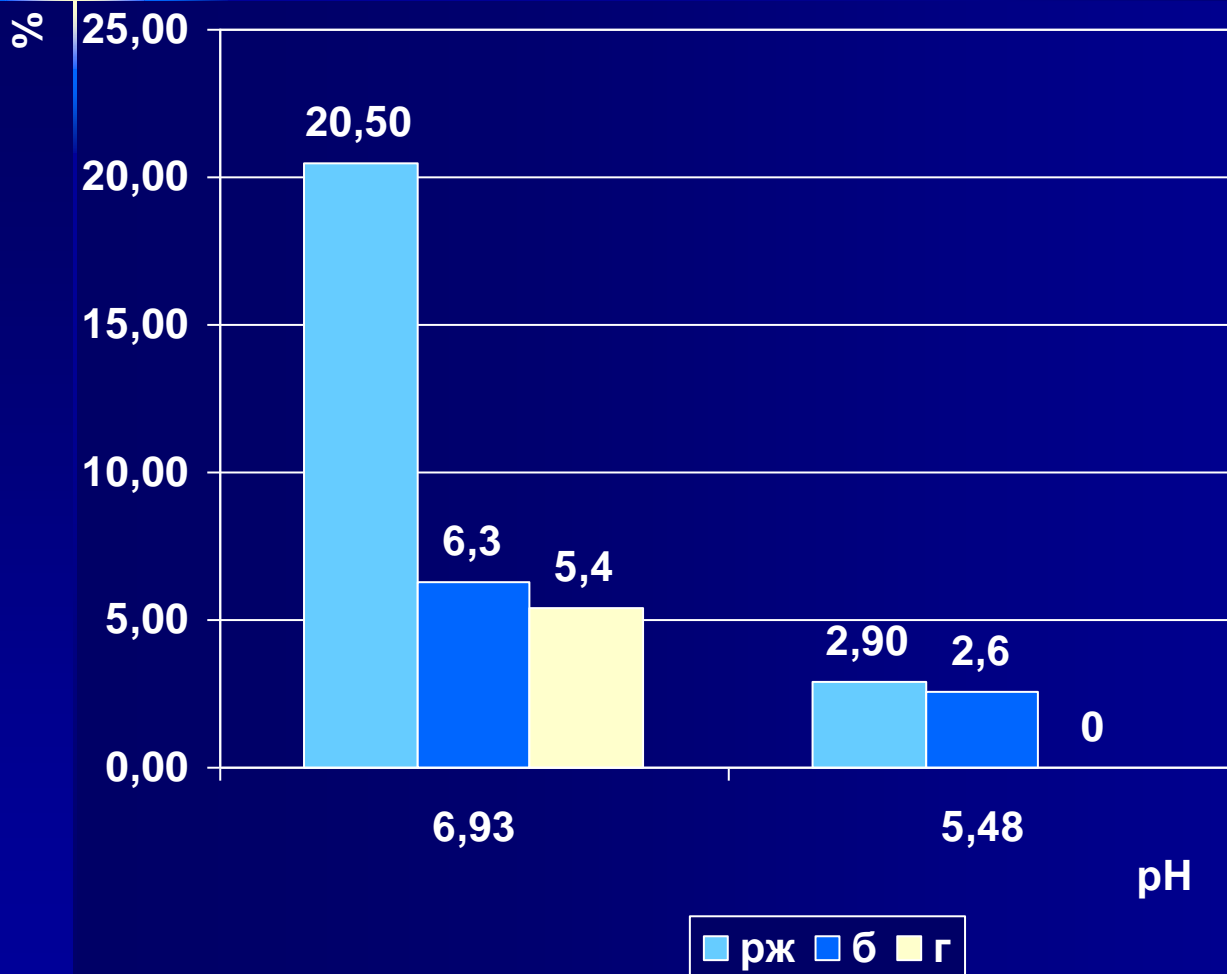


Схема развития лактатного ацидоза (SARA – sub-Acute Ruminal Acidosis)

- Увеличение содержания крахмала в рационе
- Увеличение численности *Streptococcus bovis*
- Снижение численности *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacterium*
- Запуск каскадного механизма
- Снижение численности целлюлозолитиков
- Развитие *Lactobacillus*
- Дальнейшее снижение pH
- Появление *Fusobacterium necrophorum*

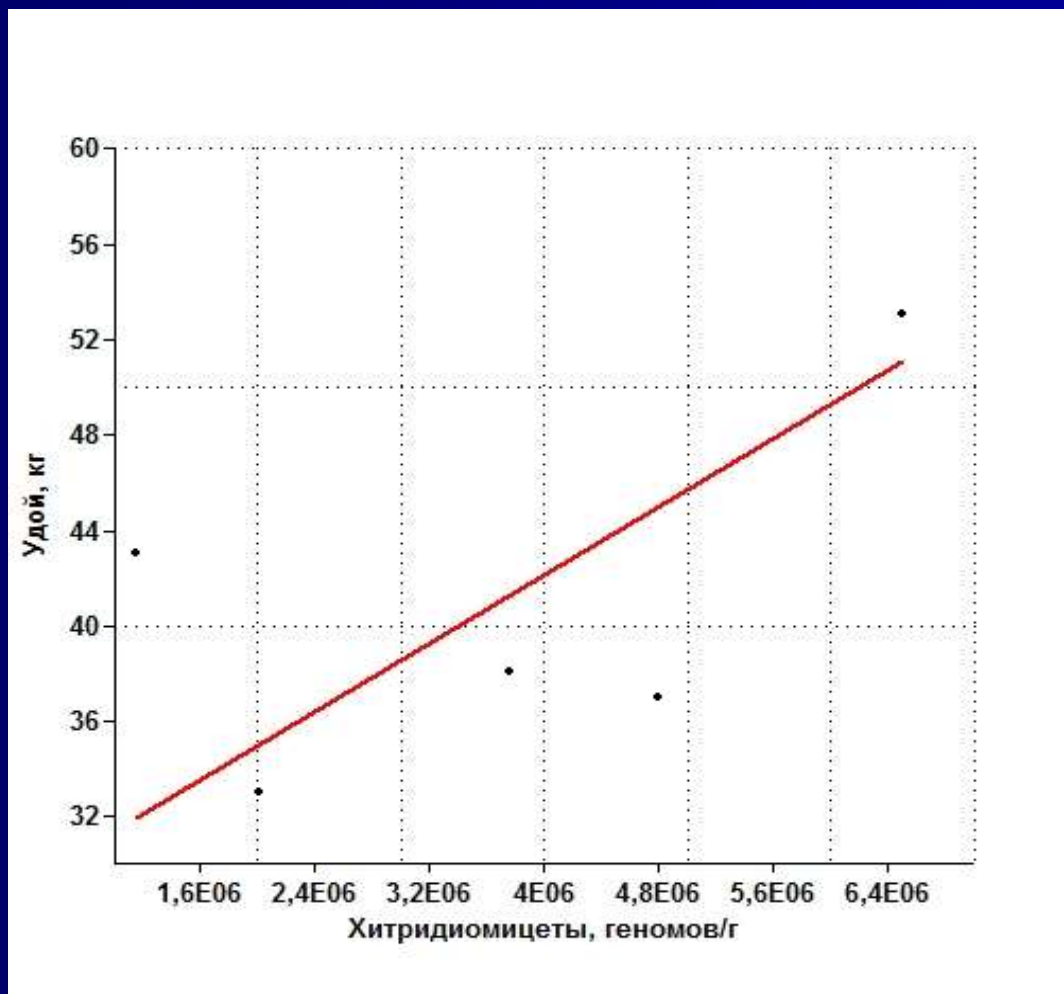
Физиологические следствия снижения рН в рубце

- Изменяется кислотно-щелочное равновесие в крови и повышается ее осмотическое давление
- Нарушается баланс стероидов (гормоны роста и беременности). Снижается содержание прогестерона. Проблемы воспроизводства.
- Появление гистамина и других вазоактивных аминов, синтезируемых *Streptococcus bovis*. Ишемия.
- Отслоение эпителия копыт (разрушение базальной мембраны вследствие ишемии и из-за активации протеиназ). Хромота.

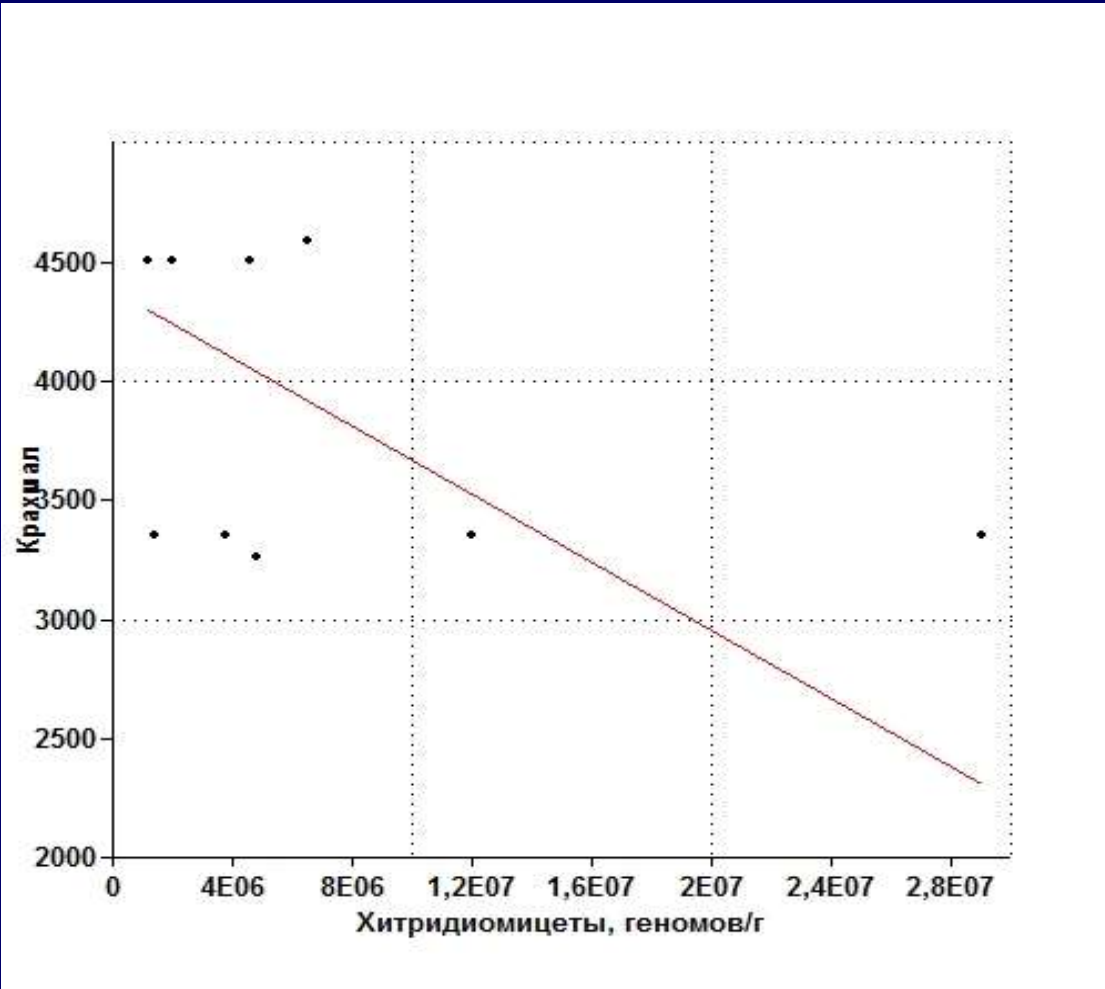
Лактатный ацидоз

- Возникает из-за несбалансированного кормления
- Является следствием микробиологических процессов в рубце
- Приводит к негативным последствиям комплексного характера
- Имеет особую специфику в хозяйствах РФ в связи с объемами поголовья

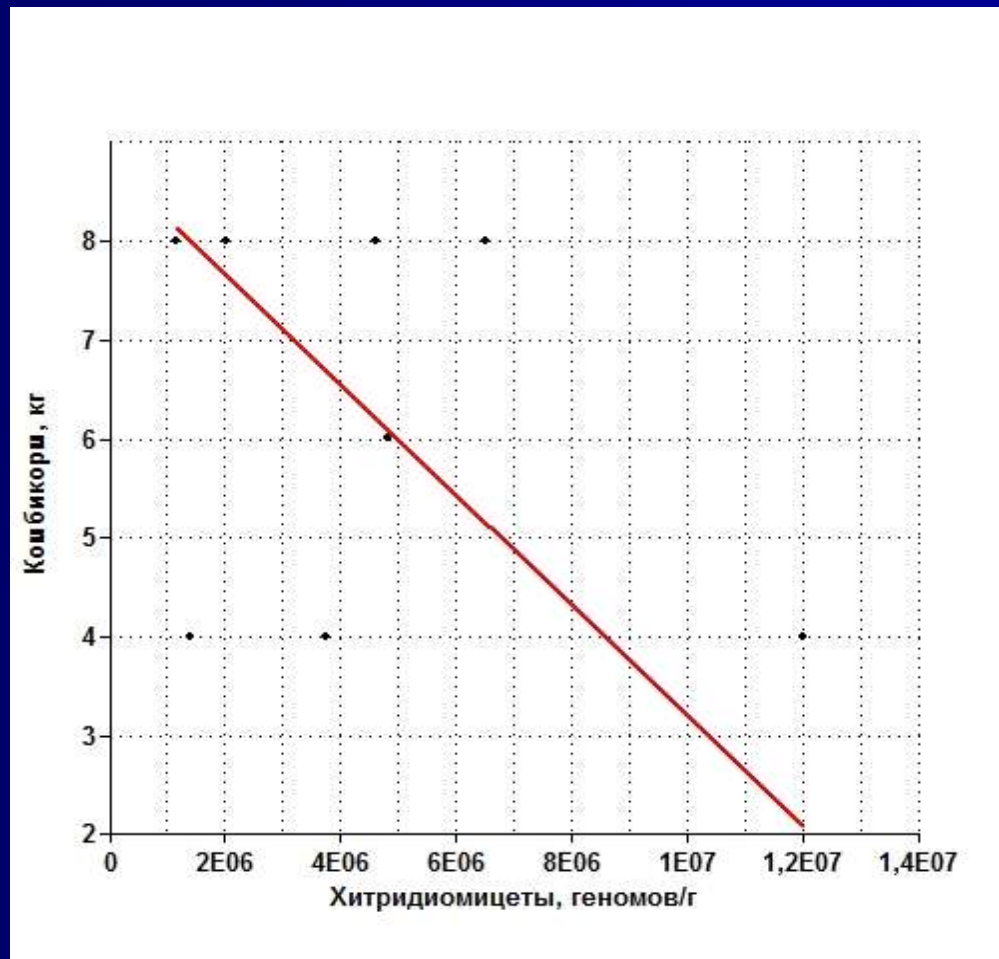
Связь между уровнем продуктивности и количеством хитридиомицетов в рубце коров.



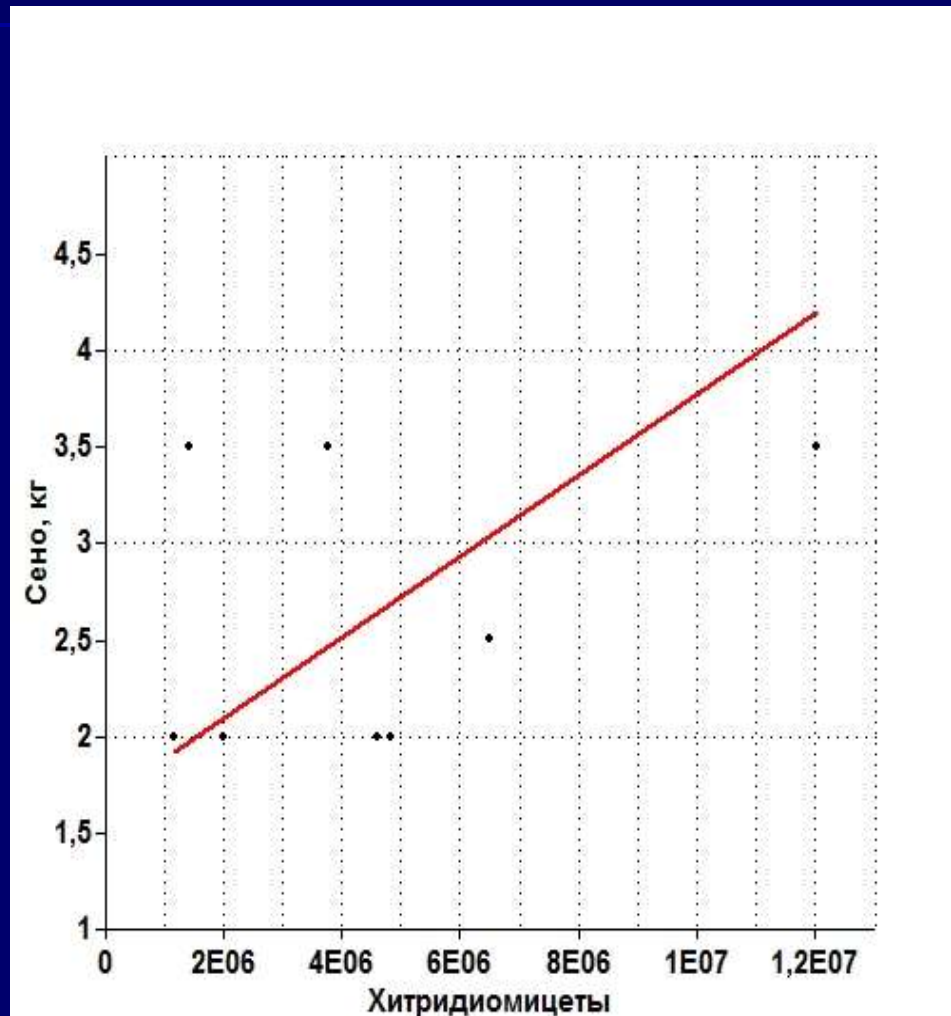
Связь между количеством крахмала в рационе и количеством хитридиомицетов в рубце коров.



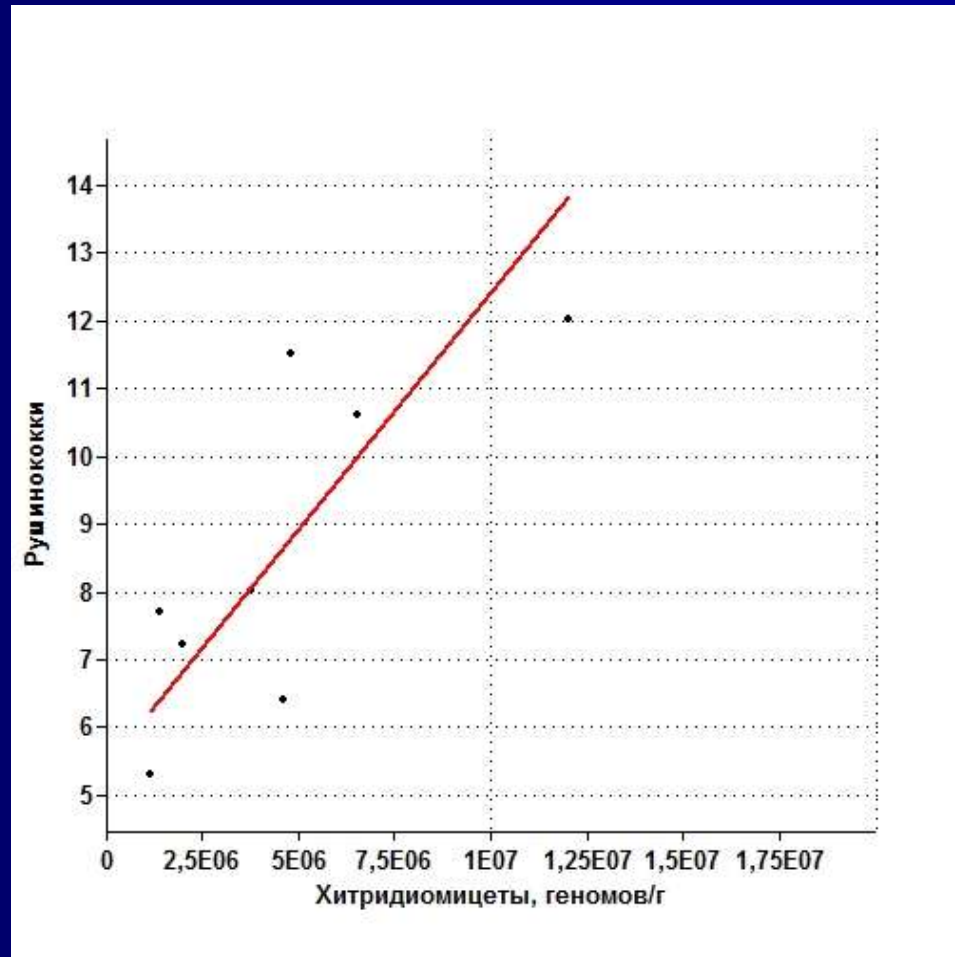
Связь между количеством комбикорма в рационе и количеством хитридиомицетов в рубце коров.



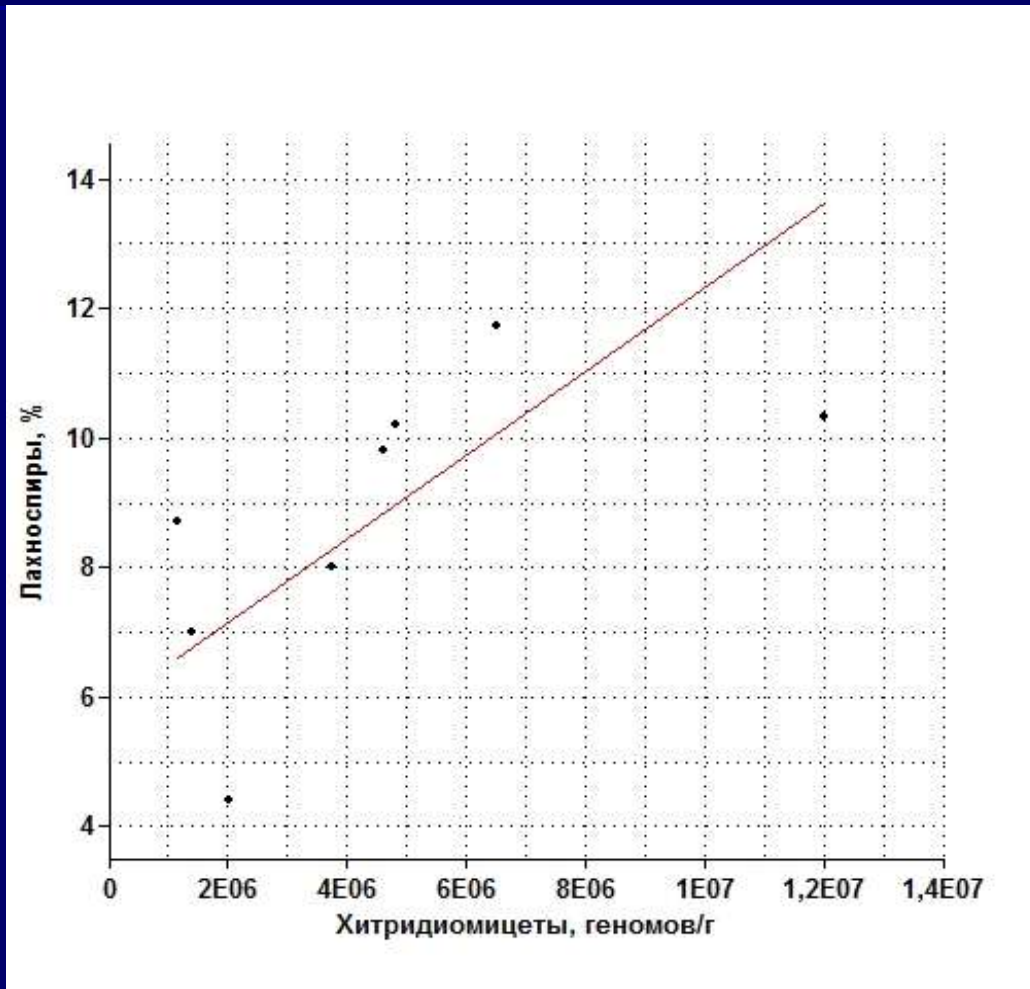
Связь между количеством сена в рационе и количеством хитридиомицетов в рубце коров.



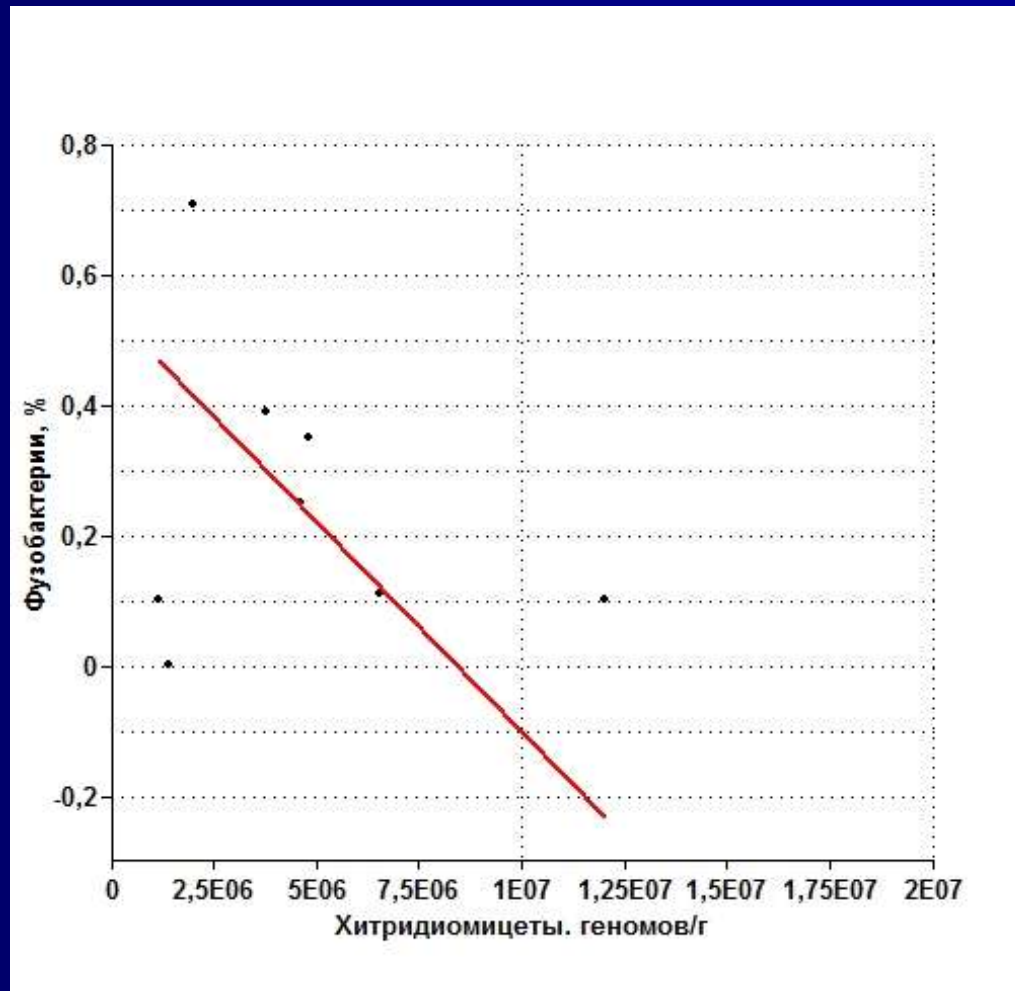
Связь между количеством хитридиомицетов и содержанием руминококков в рубце коров.



Связь между количеством хитридиомицетов и содержанием лахноспир в рубце коров.



Связь между количеством фузобактерий и содержанием хитридиомицетов в рубце коров.



Перспективы использования:

- Пробиотики
- Кормовые добавки
- Инокулянты для силоса
- Для увеличения синтеза ферментов, особенно целлюлаз

Завод НПК «БИОТРОФ»



Ферментационный зал



Производственная лаборатория









**Приглашаем к сотрудничеству!
Спасибо за внимание!**

Лаптев Георгий Юрьевич

(812) 322-85-50

8-921-996-31-71

E-mail: *georg-laptev@rambler.ru*

www.biotrof.ru