



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011121243/10, 02.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 02.12.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 02.12.2008 US 61/119,256

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2013 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 20.09.2014 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20080118472 A1, 22.05.2008. CN 101253934 A, 03.09.2008. US 20070071738 A1, 29.03.2007. RU 2205216 C2, 27.05.2003

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 04.07.2011

(86) Заявка РСТ:
 US 2009/066392 (02.12.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2010/065625 (10.06.2010)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11, 3-й этаж, "Гоулингз Интернэшнл Инк."

(72) Автор(ы):

МЕРЦ Кейт Дж. (US),
 РЕБЕРГЕР Томас Г. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДюПон Ньютришн Байосайенсиз АпС (DK),
 ЛАЛЛЕМАНД, ИНК. (СА)

(54) ИЗОЛИРОВАННЫЙ ШТАММ (ВАРИАНТЫ), ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ УЛУЧШЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, И СПОСОБ ЕГО ВВЕДЕНИЯ ЖВАЧНЫМ ЖИВОТНЫМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложены штамм *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL В-50173), штамм *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL В-50172) и штамм *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL В-50174), обеспечивающие улучшение состояния здоровья жвачных животных. На основе любого из указанных штаммов или их комбинации в сочетании с монензином получают состав, обеспечивающий улучшение состояния здоровья жвачных животных. Предложены также варианты способа

улучшения состояния здоровья жвачных животных, включающего введение указанных штаммов самих по себе или в комбинации в том числе с монензином. Предусмотрен также способ получения вводимого жвачным животным микроорганизма. Группа изобретений может быть использована для лечения или профилактики ацидоза, для улучшения показателей здоровья жвачных животных и/или повышения их продуктивности. 8 н. и 10 з.п. ф-лы, 8 ил., 11 табл., 4 пр.



Фиг. 1

R U 2 5 2 8 8 5 9 C 2 6 5 8 8 5 9

R U 2 5 2 8 8 5 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011121243/10, 02.12.2009

(24) Effective date for property rights:
02.12.2009

Priority:

(30) Convention priority:
02.12.2008 US 61/119,256

(43) Application published: 10.01.2013 Bull. № 1

(45) Date of publication: 20.09.2014 Bull. № 26

(85) Commencement of national phase: 04.07.2011

(86) PCT application:
US 2009/066392 (02.12.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/065625 (10.06.2010)

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij bul'var, 11, 3-j ehtazh,
"Goulingz Internehshnl Ink."

(72) Inventor(s):

MERTs Kejt Dzh. (US),
REBERGER Tomas G. (US)

(73) Proprietor(s):

DjuPon N'jutrishn Bajosajensiz ApS (DK),
LALLEMAND, INK. (CA)

(54) **ISOLATED STRAIN (VERSIONS) PROVIDING IMPROVEMENT IN RUMINANT'S HEALTH, METHOD FOR PREPARING IT, AND METHOD FOR ADMINISTERING IT INTO RUMINANTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to biotechnology. There are presented strain *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), strain *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172) and strain *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174) providing the improvement in ruminant's health. Any of the above strains or a combination thereof in a combination with monensin are used to prepare a formulation providing the improvement in ruminant's health. There are also presented versions of the method for the improvement in ruminant's health involving administering the above strains either alone, or in a combination with monensin as well. What is also provided is a method for producing a microorganism administered into ruminants.

EFFECT: group of inventions can be used for treating or preventing acidosis, for improving ruminant's health indicators and/or ensuring higher productiveness.

18 cl, 8 dwg, 11 tbl, 4 ex



Фиг. 1

RU 2 528 859 C 2

RU 2 528 859 C 2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к штаммам и способам контроля ацидоза. Более конкретно, данное изобретение относится к бактериальным штаммам, пригодным для улучшения здоровья жвачных животных и/или повышения их продуктивности и к способам получения и применения штаммов.

ОПИСАНИЕ УРОВНЯ ТЕХНИКИ

Применение высоких концентраций способных к ферментации углеводов в рационе жвачных животных стало широко практиковаться в мясной и молочной промышленности в течение последних 50 лет. Необходимость в повышении продуктивности и улучшении качества мяса привела к указанной тенденции. Повышение продуктивности происходило не без некоторых трудностей. Увеличение потребления способных к ферментации углеводов жвачными животными за счет потребления больших количеств зерна хлебных злаков привело к возрастанию случаев метаболических расстройств, таких как ацидоз. Взаимосвязь между потреблением больших количеств зерна и ацидозом у жвачных животных подробно описана в обзорах (Dunlop, 1972; Slyter, 1976). Многие исследователи выявили уменьшение рН в организме жвачных животных после потребления скотом больших количеств углеводов, способных к ферментации (RFC), и последующего разрушения рубцовой микробиоты и физиологических изменений, происходящих в организме животных (Allison et al., 1975; Hungate et al., 1952; Elam, 1976). Большая часть исследователей приписывает это уменьшение чрезмерному продуцированию органических кислот Рубцовыми бактериями, такими как *Streptococcus bovis*. Однако влияние избыточного количества углевода на рубцовую микробиоту, которое инициирует такой ответ, до сих пор подробно не описано.

В прошлом эффективное управление составом рациона было единственным способом борьбы с ацидозом. Более конкретно, зерно разбавляли грубым кормом и увеличивали количество пищевого концентрата, тщательно контролируя это увеличение постепенно, чтобы обеспечить равный переход к большим количествам концентрата в течение 14-21 дней. Большинство промышленных площадок для откорма скота используют получение и доставку нескольких "адаптационных" кормов, которые содержат зерно и кормовые растения в различных соотношениях.

Хотя составление кормовых рационов обычно является довольно эффективным при контроле ацидоза, оно является очень дорогостоящим для производителя из-за высокой стоимости получения, транспортировки, измельчения кормовых растений, утилизации увеличившихся отходов и низкой производительности. Производители кормов и менеджеры на площадках для откорма скота должны применять такие подходы, которые позволят осуществить эффективное получение рационов с высоким содержанием концентратов.

Другие подходы пытались объединить применение адаптационных кормов с питательными антимикробными компонентами, такими как ионофоры. Ионофоры ингибируют поглощение и уменьшают образование молочной кислоты в рубце путем снижения руминальных популяций грамположительных организмов, продуцирующих молочную кислоту, таких как *Streptococcus bovis* и *Lactobacillus spp.* (Muir et al., 1981).

Хотя применение ионофоров снизило возможность возникновения острого ацидоза на площадках для откорма скота, нежелание производителей использовать антибиотики в производстве мяса и необходимость в непрерывном поиске путей уменьшения расходов при повышении продуктивности животных и улучшении качества туш животных привели к изучению альтернативных способов уменьшения случаев ацидоза и повышения

продуктивности скота на площадках для откорма.

Применение непосредственно вводимых микробов (DFM) как метода модулирования функции рубца (первого отдела желудка) и повышения продуктивности животных получило все большее распространение в течение последних 10 лет. Существуют две
5 основных технологии непосредственного введения микробов, которые доступны в настоящее время в мясной промышленности для контроля ацидоза в рубцовом содержимом: (1) применение технологии DFM, продуцирующих молочную кислоту, и
10 (2) добавление специфических видов бактерий, способных использовать молочную кислоту в рубцовом содержимом. Хотя описанный механизм действия указанных двух технологий является различным, обе эти технологии пытаются решить проблему с накоплением молочной кислоты в рубцовом содержимом.

Первый подход, а именно применение DFM, продуцирующих молочную кислоту, предусматривает повышение скорости утилизации молочной кислоты в рубцовом содержимом путем стимулирования нативной руминальной флоры. Как сообщалось,
15 добавление сравнительно медленно растущих бактерий, продуцирующих молочную кислоту, таких как виды *Enterococcus*, приводит к образованию слегка повышенной концентрации молочной кислоты в рубцовом содержимом. Постепенное увеличение приводит к адаптации микрофлоры в рубце к большему количеству утилизирующих молочную кислоту компонентов. Однако эти штаммы *Enterococcus* не обеспечили
20 адекватного контроля и предотвращения ацидоза.

Второй подход, а именно добавление специфических видов бактерий, способных к утилизации молочной кислоты в рубцовом содержимом, основан на обнаружении того факта, что вид *Propionibacterium* значительно минимизирует накопление молочной
25 кислоты в рубцовом содержимом во время вспышки ацидоза с большим количеством легко поддающегося ферментации углевода (RFC). *Propionibacterium* являются природными компонентами рубцового содержимого у молочных и мясных животных и функционируют в рубце с использованием молочной кислоты для продуцирования
важных летучих жирных кислот, таких как уксусная и пропионовая.

Современные технологии с применением DFM, появившиеся к настоящему времени,
30 основаны на устаревшем понимании причин возникновения ацидоза в рубце. До настоящего времени методы изучения микробной экологии рубца основывались на методике культивирования. Эти методики были ограничены из-за неизвестности требований к росту бактерий и неподходящих анаэробных условий для многих микроорганизмов в рубцовом содержимом. Таким образом, экологические исследования,
35 основанные на этих методиках культивированные, полагались на ограниченное понимание природы руминальной микробиоты.

Используемые в настоящее время DFM, применяемые в отдельности или с дрожжами для минимизации риска ацидоза в рубце и улучшения утилизации корма, даваемого на площадках для откорма скота, содержащего концентрат в большом количестве,
40 обеспечили получение неоднозначных результатов. Однако изучение штаммов DFM *Propionibacterium* H15 и *Enterococcus faecium* EF212 и *E. faecium* EF212, добавляемых в отдельности или в комбинации с дрожжами, *Saccharomyces cerevisiae*, показало, что добавление DFM вместе с дрожжами или без них не оказывает влияния на предотвращение ацидоза в рубце (Yang W., 2004).

С учетом сказанного выше, было бы желательно обеспечить создание одного или более штаммов для профилактики и/или лечения ацидоза. Было бы предпочтительно,
45 если один или более штаммов привели к улучшению здоровья жвачных животных и/или к повышению их продуктивности. Было бы также желательно разработать способы

получения и применения этих штаммов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение, объем которого определен формулой изобретения, приведенного в конце данного описания, предусматривает решение по меньшей мере некоторых проблем, указанных выше. Предусмотрены изолированные штаммы, включая штамм 8G-1 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), который обладает всеми идентифицирующими признаками штамма 8G-1 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), штамм 8G-73 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), штамм, имеющий все идентифицирующие признаки штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), штамм 8G-134 *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), штамм, имеющий все идентифицирующие характеристики штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), и их комбинации.

Кроме того, предусмотрена комбинация, включающая один или более штаммов, указанных выше, и монензин.

Предусмотрен также способ введения эффективного количества одного или более штаммов, перечисленных выше, животному и способ введения комбинации, включающей эффективное количество одного или более штаммов, перечисленных выше, и монензин, животному.

Согласно по меньшей мере некоторым вариантам введение одного или более штаммов животному обеспечивает наличие по меньшей мере одного из следующих преимуществ для животного, по сравнению с животным, которому не вводили штамм: (а) уменьшение ацидоза, (б) стабилизация метаболизма в рубце, о чем свидетельствует замедленное накопление молочной кислоты и пролонгирование продуцирования летучих жирных кислот, (в) более быстрое восстановление после вспышки ацидоза, о чем свидетельствует восстановление величины рН и уменьшение содержания молочной кислоты, (г) уменьшение проявления клинических симптомов, связанных с ацидозом, (д) увеличение образования молока у дойных коров, (е) повышение содержания жира в молоке у дойных коров, (ж) снижение количества соматических клеток (SCC) у дойных коров, (з) улучшение иммунологического отклика и здоровья, о чем свидетельствует снижение SCC, и (и) повышение продуктивности дойных коров,

Предусмотрен также способ получения непосредственно вводимых микробных препаратов. В этом способе штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма 8G-1 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172) и штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), выращивают в жидком питательном бульоне. Штамм выделяют из жидкого питательного бульона с получением микробного препарата для непосредственного введения (скармливания). Согласно по меньшей мере некоторым вариантам этого метода штамм высушивают при замораживании.

Дополнительно предусмотрен способ получения непосредственно скармливаемого микробного препарата. В этом способе штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма 8G-1 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172) и штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), выращивают в жидком питательном бульоне. К этому микробному препарату для непосредственного скармливания добавляют монензин.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Предпочтительные примерные варианты изобретения, описанные в данной заявке, иллюстрируются прилагаемыми рисунками, на которых имеется одинаковая нумерация одних и тех же позиций и которые представляют собой следующие Фигуры.

На Фигуре 1 приведен график, показывающий разницу в величине рН у испытуемой популяции (неацидозной; кластер 2) и контрольной (ацидозной; кластер 1) популяции.

На Фигуре 2 приведен график, показывающий различия накопления молочной кислоты у испытуемой популяции (неацидозной; кластер 2) и контрольной (ацидозной; кластер 1) популяции.

На Фигуре 3 показан график, показывающий зависимость величины концентрации глюкозы *in vitro* от времени лечения,

На Фигуре 4 показан график, показывающий зависимость величины концентрации молочной кислоты *in vitro* от времени лечения.

На Фигуре 5 приведен график зависимости величины концентрации VFA (ацетат + пропионат + бутират) от времени.

На Фигуре 6 приведен график зависимости средней величины pH рубцового содержимого от времени у контрольных животных и животных с DFM.

На Фигуре 7 показан график зависимости средней величины лактата в рубцовом содержимом от времени у контрольных животных и животных с DFM.

Фигура 8 показывает график зависимости величин концентрации VFA в зависимости от времени лечения (общее содержание VFA = ацетат + пропионат + бутират).

Прежде чем ниже будут описаны подробно варианты изобретения, следует уяснить, что данное изобретение не ограничивается деталями и компонентами, описанными в описании и показанными на рисунках. Данное изобретение может иметь и другие варианты и может быть осуществлено другими путями. Следует также иметь в виду, что фразеология и терминология, применяемые в данной заявке, служат для описания изобретения и не следует их рассматривать как ограничивающие изобретение.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение предусматривает штаммы. Предусмотрены также способы получения и применения этих штаммов.

Согласно по меньшей мере некоторым вариантам непосредственно скармливаемые микробные препараты (DFM), получаемые при помощи одного или более штаммов, предусмотренных изобретением, дают возможность производителям мяса и молока продолжать применять схемы питания для оптимизации роста и продуктивности без ухудшения здоровья животных, вызванного расстройством пищеварения, связанным с ацидозом в рубце. По меньшей мере некоторые варианты DFM выбраны на основании регулирования концентраций лактата в рубцовом содержимом путем утилизации лактата или сенсibilизации рубца для поддержания микрофлоры, утилизирующей лактат. Созданы по меньшей мере некоторые варианты DFMs для поддержания необходимой энергии в рубце. В отличие от DFMs, имеющих на рынке в настоящее время для облегчения ацидоза, по меньшей мере некоторые варианты изобретения не были созданы для решения проблемы после ее возникновения, а скорее предназначены для предотвращения возникновения этой проблемы.

Штаммы:

Согласно данному изобретению предусмотрены штаммы, которые включают штамм 8G-1 *Enterococcus faecium*, штамм 8G-73 *Enterococcus faecium* и штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*, которые в данной заявке обозначаются как 8G-1, 8G-73 и 8G-134, соответственно.

Штаммы *Enterococcus faecium* 8G-1, *Enterococcus faecium* 8G-73 и *Bacillus pumilus* 8G-134 были депонированы 29 августа 2008 г в Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604 и получили номера доступа В-50173, В-50172 и В-50174, соответственно. Депонирование было осуществлено в соответствии с условиями Будапештского Договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Один или более

штаммов, указанных выше, может быть использован в качестве непосредственно скармливаемого микроорганизма (DFM).

Для целей данного изобретения термин "биологически чистый штамм" означает штамм, не содержащий никаких других бактериальных штаммов в количествах, достаточных для воздействия на процесс репликации штамма или для обнаружения их обычными бактериологическими методами. Термин "изолят" в отношении организмов и культур, описанных в данной заявке, включает не только биологически чистый штамм, но также любую культуру организмов, которая выращена или выделена из натурального сырья. Согласно некоторым вариантам штаммы представляют собой мутанты, варианты или производные штаммов 8G-1, 8G-73 или 8G-134, которые также имеют преимущества по сравнению со штаммами 8G-1, 8G-73 и 8G-134. Согласно некоторым вариантам штаммы представляют собой штаммы, обладающие всеми идентифицирующими признаками штаммов 8G-1, 8G-73 или 8G-134. Кроме того, каждый индивидуальный штамм (8G-1, 8G-73 или 8G-134) или любая комбинация этих штаммов могут также обеспечить одно или более преимуществ, описанных в данной заявке. Очевидно также, что добавление других штаммов микроорганизмов, носителей, добавок, ферментов, дрожжей и т.п. также обеспечит осуществление контроля за ацидозом и не приведет к получению существенно отличающегося DFM.

Штаммы *Bacillus* имеют много качеств, которые делают их полезными для применения в качестве DFM. Например, некоторые виды *Bacillus* имеют статус GRAS (обычно признаваемые как безопасные), то есть они обычно признаны как безопасные US Food and Drug Administration и одобрены также для применения в кормах для животных Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Штаммы *Bacillus*, описанные в данной заявке, являются аэробными и факультативными спорообразующими и, таким образом, являются стабильными. Виды *Bacillus* представляют собой единственные спорообразующие штаммы со статусом GRAS. Штамм *Bacillus*, который, как было обнаружено, предотвращает или лечит ацидоз, представляет собой штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*.

Штаммы *Enterococcus* также имеют много свойств, которые делают их пригодными для применения в качестве DFM.

Как известно, штаммы *Enterococcus* находятся в желудочно-кишечном тракте моногастрических животных и жвачных животных и выживают в этой среде. Было показано, что *Enterococcus* являются факультативными анаэробными организмами, что придает им стабильность и активность как в аэробных условиях, так и в условиях кислородного голодания. Штамм 8G-1 *Enterococcus faecium* и штамм 8G-73 *Enterococcus faecium* были идентифицированы изобретателями как полезные для этих целей.

Получение штаммов:

В соответствии с по меньшей мере одним вариантом каждый из штаммов, описанных в данной заявке, культивируется в отдельности с использованием обычных методов жидкофазной или твердофазной ферментации. Согласно по меньшей мере одному варианту штамм *Bacillus* и штаммы *Enterococcus* выращивают в жидкой питательной среде, в случае *Bacillus* - до образования самого большого количества спор. Штамм *Bacillus* получают путем ферментации штамма бактерий, этот процесс начинается с масштабирования посеянной культуры. Он включает повторяющуюся в асептических условиях передачу культуры во все увеличивающийся объем, где она служит в качестве инокулята для ферментации, которая может быть осуществлена в больших ферментерах из нержавеющей стали в среде, содержащей белки, углеводы и минералы, которые необходимы для оптимального роста. Неограничивающими примерами сред являются

MRS или TSB. Однако можно использовать и другие среды. После добавления инокулята в ферментер для достижения максимального роста контролируют температуру и скорость перемешивания. По одному из вариантов штаммы выращивают при температуре от 32°C до 37°C при перемешивании. Как только достигается максимальная плотность популяции, культуру собирают путем отделения клеток от среды для ферментации. Обычно это осуществляют путем центрифугирования.

Согласно одному из вариантов при получении штамма *Bacillus* ферментацию штамма *Bacillus* проводят до плотности от 5×10^8 кое/мл до примерно 4×10^9 кое/мл. Согласно по меньшей мере одному варианту величина плотности популяции составляет 2×10^9 кое/мл. Бактерии собирают путем центрифугирования и удаляют надосадочную жидкость. Затем пеллетированные бактерии можно применять для получения DFM. Согласно по меньшей мере некоторым вариантам пеллетированные бактерии сушат при замораживании и затем используют для получения DFM. Однако нет необходимости высушивать *Bacillus* замораживанием перед их применением. Штаммы можно также использовать с консервантами или без них в концентрированном, неконцентрированном или в разбавленном виде.

Затем может быть определено количество микробов, образующих колонии, Кое, или колониеобразующая единица, обозначает количество жизнеспособных клеток в образце, полученных стандартными методами микробиологического посева. Термин произошел от того, что одна клетка, посеянная в подходящей среде, будет расти и образовывать жизнеспособную колонию на агаре. Поскольку многие клетки образуют одну видимую колонию, термин "колониеобразующая единица" является более полезной единицей измерения, чем количество клеток.

Применение штаммов:

Согласно по меньшей мере некоторым вариантам для образования DFM применяют один или более штаммов. К штамму могут быть добавлены один или более носителей, включая, но без ограничения, сахарозу, мальтодекстрин, известняк и рисовую шелуху.

Для смешения штамма (-ов) и носителей (когда они используются) их добавляют в ленточный или лопастный смеситель и перемешивают в течение примерно 15 мин, хотя это время можно увеличить или уменьшить. Компоненты перемешивают до получения однородной смеси культур и носителей. Конечный продукт преимущественно представляет собой сухой текучий порошок, на его основе может быть получен продукт с желательной конечной концентрацией DFM.

Согласно по меньшей мере одному варианту данного способа получения DFM, штамм, описанный в данной заявке, выращивают в такой среде, как жидкий питательный бульон. Штамм отделяют от жидкой питательной среды для получения непосредственно скармливаемого препарата. Штамм после отделения от бульона может быть высушен замораживанием.

Один или более штаммов, выбранных из штамма 8G-1 *Enterococcus faecium*, штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* и штамма 8G-134 *Bacillus pumilus*, можно скармливать животным для уменьшения или даже устранения случаев возникновения ацидоза. Для этой цели животным вводят эффективное количество одного или более штаммов. После введения животным штамм (штаммы) обеспечивает (-ют) по меньшей мере одно из следующих преимуществ для животных: (а) уменьшает (-ют) ацидоз у животных, (б) стабилизирует (-ют) метаболизм в рубце, о чем свидетельствует замедленное накопление молочной кислоты и пролонгированное образование летучих жирных кислот, (в) обеспечивает (-ют) более быстрое восстановление животных после вспышки ацидоза, что показывают величина рН и уменьшение количества молочной кислоты, и (г) не

вызывает (-ют) проявления клинических признаков, связанных с ацидозом.

В качестве животных используют скот, включая мясных и молочных животных, то есть одного или более животных из быков, бычков-кастратов, телок, телят или коров; козлов, овец, лам, альпак; других животных с четырехкамерным желудком и жвачных животных, у которых может быть дисбаланс в рубце, когда их питают легко ферментирующимся углеводом (RFC).

Согласно по меньшей мере одному из вариантов, когда животным скармливают штамм 8G-1 *Enterococcus faecium* или штамм 8G-73 *Enterococcus faecium*, этот штамм вводят в таком количестве, что животные ежедневно получают от примерно 5×10^8 кое/голову/день до примерно 5×10^{10} кое/голову/день. Согласно по меньшей мере одному варианту, когда животным скармливают штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*, этот штамм вводят в таком количестве, чтобы животные ежедневно получали от примерно 5×10^8 кое/голову/день до примерно 5×10^{10} кое/голову/день. В соответствии с по меньшей мере одним вариантом в случае введения двух и более штаммов из штамма 8G-1 *Enterococcus faecium*, штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* и штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* эти штаммы вводят животным в таком количестве, что они ежедневно получали от примерно 5×10^8 кое/голову/день до примерно 5×10^{10} кое/голову/день в виде общей дозы штаммов. Штамм может вводиться животным в возрасте от 30 дней в течение всей продуктивной жизни взрослых жвачных животных или в течение других промежутков времени.

Согласно по меньшей мере одному варианту штамм скармливают как непосредственно скармливаемый микробный препарат (DFM), и DFM используется в виде подкормки к дневному рациону. Кроме того, штамм может скармливаться в составе общего смешанного рациона, гранулированного корма, смешанного с жидким кормом, в виде штамма, смешанного с белковым премиксом, в составе витаминного и минерального премикса.

Согласно по меньшей мере одному варианту штамм вводится как DFM и DFM скармливается в сочетании с лекарственным монензином типа А (Rumensin®) в дневной дозе, равной примерно 50-660 мг/животное. Монензин скармливают для повышения эффективности питания, так как ионофор обеспечивает проницаемость мембраны бактериальной клетки, создающей дисбаланс ионов между внутриклеточным и внеклеточным пространством. Этот отклик влияет на популяции микробиот в рубце и ферментацию корма для улучшения эффективности питания животных.

Согласно по меньшей мере одному варианту штамм вводится как DFM и DFM скармливают в сочетании с лекарственным тилозинфосфатом типа А (Tylan®) в дневной дозе, равной примерно 60-90 мг/голову. Тилозинфосфат скармливают мясным животным для уменьшения абсцессов в печени, вызванных *Fusobacterium necrophorum* и *Actinomyces pyogenes*.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры приведены только с целью иллюстрации. Эти примеры включены только для более полного понимания описанного изобретения. Примеры не ограничивают объем изобретения, описанного и заявленного в данной заявке.

Пример 1

Экспериментальная модель ацидоза:

Десять кроссбредных бычков-кастратов распределяли по весу в два загона. Дневной рацион всех испытуемых животных до их отбора состоял из 45% грубого корма и 55% концентрата в расчете на сухую основу. Скоту давали рацион один раз утром (15 ф/

голову/день), а остальной корм помещали ближе к стойловой раме поздно вечером. Животных в обоих загонах выдерживали на голодной диете в течение 24 ч до выбора и затем давали кормовой концентрат. Кормовой концентрат состоял из быстро ферментирующихся источников углеводов, обработанных паром кукурузных хлопьев (90% основы). После голодной диеты в течение 24 ч концентрат давали в неограниченном количестве, загружая 100 ф/загон во все загоны (0ч). Потребление выбранного стимулирующего корма отслеживали визуально и, если это было необходимо, загружали дополнительное количество корма.

Образцы жидкости из рубца получали от отдельных животных путем оральной интубации с применением трубки, соединенной с вакуумной колбой. Разные колбы и трубки для отбора проб применяли для каждого загона для того, чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение микробиоты. Жидкость из рубца, отобранную в вакуумную колбу, декантировали в стерильные трубки Falcon объемом 50 мл и прикрепляли к ним этикетки с указанием времени отбора пробы и номера животного (метки в ухе). Образцы содержимого рубца отбирали у животных в обоих загонах в моменты времени -36 ч, -24 ч и -12 ч. Образцы, отобранные в моменты времени -36 ч и -24 ч, представляли исходные физиологические данные для каждого животного. Образцы, отобранные в момент времени -12 ч, отражали показатели жидкого содержимого рубца натошак для каждого животного. Момент времени 0ч означает начало подачи корма. Пробы жидкого содержимого рубца отбирали от всех животных каждые 4 ч, начиная от +6 ч до +22 ч. Образцы из всех загонов отбирали в моменты времени +28, +36 и +48 ч. Величину pH образцов содержимого рубца определяли сразу же после взятия пробы. Все образцы замораживали и подготавливали для отправки в Agtech Products, Inc. (Waukesha, WI) для дальнейшего анализа.

Содержание летучих жирных кислот и углеводов определяли в каждой пробе содержимого рубца в отдельности. Для проведения анализа методом HPLC из жидкого содержимого рубца, отобранного у каждого животного в определенный момент времени, отбирали дубликаты образцов объемом 1,0 мл. Образцы помещали в трубку (1,5 мл) микроцентрифуги и центрифугировали (10 мин, 12500 об/мин) с получением осадка. Надосадочную жидкость (750 мкл) помещали в чистую пробирку и подкисляли равным объемом 5 мМ H₂SO₄. Подкисленную жидкость тщательно перемешивали и отфильтровывали через 0,2 мкм фильтр в пробирку (2 мл) для автоматического отбора образцов HPLC и закрывали ее. Образцы анализировали при помощи системы Waters 2690 HPLC (Waters Inc., Milford, MA). Образцы впрыскивали в мобильную фазу (5 мМ H₂SO₄), нагретую до 65°C, и разделяли, применяя колонку BioRad HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Стандартизацию метода HPLC проводили, применяя ряд концентраций для каждого тестируемого соединения. В качестве стандартов использовали декстрозу (глюкозу) лактат, метилглиоксаль, бутират, пропионат и ацетат.

Определение бактериальных генов в неацидозной микрофлоре жвачных животных
Супрессивная субтрактивная гибридизация

Для определения разницы в популяциях микробов в двух наборах отобранных образцов содержимого рубца применяли набор Genome Subtraction Kit (Klontech, Palo Alto, CA). Проводили иерархический кластерный анализ для определения сходства и различия между животными, измеряли величины pH и профили молочной кислоты во времени. Кластерный анализ позволил выявить животных 2069, 2071, 2078, 2113 и 2127 в кластере 1 и животных 2107, 2115, 2088, 2133 и 2124 в кластере 2. Проводили повторный анализ для сравнения величин pH и профилей молочной кислоты для кластера 1 и кластера 2. Все переменные анализировали по отдельности. Кластер 1 характеризовался

значительно более высоким средним значением профиля молочной кислоты по сравнению с кластером 2 ($P=0,0004$) и меньшим средним значением величины рН ($P=0,037$) в течение всего периода потребления стимулирующего корма (Фигуры 1 и 2). Жидкое содержимое рубца собирали в кластере от каждого отдельного животного для

5 осуществления метода супрессивной субтрактивной гибридизации.

Стратегия проведения супрессивной субтрактивной гибридизации (SSH) была выбрана для того, чтобы сравнить образцы ДНК содержимого рубца у скота в кластере 1 с образцами в кластере 2, время отбора образцов составляло: +6 ч, +10 ч, +14 ч и +18 ч. Супрессивную субтрактивную гибридизацию осуществляли, используя животных в

10 кластере 2 в качестве испытуемых (неацидозный скот) и животных в кластере 1 в качестве контрольной (драйвер) популяции. SSH гипотетически должна была привести к получению уникальных фрагментов ДНК из организмов, которые обеспечивают низкое содержание молочной кислоты и более высокие величины рН (энергия в рубце стимулирует организм). Осуществив субтракции с использованием образцов, отобранных

15 в момент времени +10 ч, получили фрагменты (гены) ДНК из организмов, которые были способны модулировать утилизацию избытка энергии в содержимом рубца в виде RFC и ослаблять возможное действие ацидоза.

Клонирование и скрининг библиотеки уникальных испытуемых последовательностей

Специфические последовательности ДНК штаммов, выделенные после субтракции,

20 клонировали для дальнейшего анализа. Последовательности ДНК вставляли в вектор pCR2.1 (Invitrogen) и трансформировали в клетки компетентной культуры штамма E.coli TOP-10. Смесь для трансформации помещали в чашки Петри 22×22 см с агаром LB, содержащие 50 мкг/мл канамицина, и сверху наносили X-gal в DMF (40 мг/мл). Чашки Петри инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Рекомбинантные колонии

25 (белые колонии) собирали в стерильные микротитрационные планшеты, содержащие среду LB и канамицин (50 мкг/мл). Содержимое всех лунок, содержащее продукты рекомбинантной ПЦР, разделяли на Аликвоты, равные 1 мл. Одну аликвоту очищали, используя набор Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), вторую аликвоту гранулировали

30 путем центрифугирования, вновь суспендировали в среде LB + Kan + 10% глицерина и хранили при температуре -80°C.

Саузерн-гибридизация

Проводили слот-блот гибридизацию, используя стандартные протоколы. Для подтверждения специфичности клонированных вставок ДНК положительно заряженные

35 блоттирующие мембраны Zeta-Probe® Blotting Membranes (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) подвергали гибридизации при помощи проб из исходных тестер-ДНК и драйвер-ДНК, расщепленных при помощи AluI и меченных дигоксигенином с применением набора DIG High Prime DNA labeling Kit (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, IN). Рекомбинантные вставки, характеризующиеся гомологичностью последовательностей

40 тест-ДНК, но не драйвер-ДНК, были выбраны для анализа последовательностей осуществляли гибридизацию клонированных вставок. В каждый промежуток времени осуществляли субтракцию, 6, 10, 14 и 18. Из SSH 6, 10, 14 и 18 клонированные вставки 12, 29, 105 и 29, соответственно, были тестер-специфическими.

Была определена ДНК последовательность из каждой тестер-положительной вставки (Lark Technologies; Houston, TX). Последовательность из каждой вставки сравнивали с

45 последовательностями в базе данных NCBI с использованием функции blastX.

Осуществляли трансляцию нуклеотидных последовательностей и путем сравнения последовательностей с последовательностями в базе данных NCBI с применением функции blastX определяли функцию генов. Функцию генов относили к категории генов,

используя веб-сайт Clusters of Orthologous Groups (COG), где представлены ортологичные гены. Идентифицированные гены COG использовали для получения конструктора олигонуклеотидных проб для гибридизации колоний и слот-блот гибридизации. Четыре гена из 29 были выбраны из SSH 10 для гибридизации колоний на основе функциональных атрибутов при выборе животных из числа, не страдающих от ацидоза. Гены, выбранные из клонов 79, 84, 94 и 110, идентифицировали при помощи программы NCBI blastX с функциями бета-ксилозидазы, транспортера глюкозы/галактозы, 4-альфа-глюканотрансферазы и 4-альфа-глюканотрансферазы, соответственно. Все гены, выбранные для проведения гибридизации колоний, имели определенные свойства, идентифицированные согласно COG как функции метаболизма и переноса углеводов, которые обеспечивают полученным бактериям, содержащим эти гены, преимущество в метаболизме избытка энергии, который обнаруживается в рубце, сенсibilизированном при помощи RFC.

Гибридизация колоний

Жидкое содержимое рубца, собранное во время определения ацидоза у животных в моменты времени +10 ч, +14 ч и +18 ч, использовали для осуществления гибридизации. Во время каждого из указанных периодов были выбраны животные 2107, 2124, 2115, 2088 и 2133. Эти экземпляры являются представителями животных, которых отобрали ранее для "тестер-популяции" или группы, не страдающей от ацидоза. Отдельные образцы содержимого рубца отбирали при -20°C и давали им разморозиться при комнатной температуре. Размороженные образцы содержимого рубца высевали в отдельности в трех отдельных средах (используя дубликаты). Используемые среды состояли из агара с лактатом натрия (NLA), лактатного агара для селективного выделения *Propionibacterium* (LPSA) и модифицированной среды для *Clostridial* усиленной (RCS). RCS была похожа на коммерчески доступную среду для клостридий усиленную и не содержащую глюкозы. Таким образом, основным источником углеводов в RCS является крахмал.

Таблица 1, приведенная ниже, показывает условия инкубации и разбавления жидкого содержимого рубца, посеянного в каждой среде.

Таблица 1.				
Условия инкубации и разбавления в каждой среде				
Условия инкубации				
Среда	Условия O ₂	Время инкубации	Температура инкубации	Разбавление
LPSA	анаэробные	7 дн	32°C	10-1, 10-2
NLA	анаэробные	5 дн	37°C	10-2, 10-3
RCS	анаэробные	48 ч	37°C	10-1, 10-2

После инкубации собирали отдельные колонии и инокулировали в пробирках с 10 мл бульона, состоящего из соответствующей среды, кроме LPSA, который инокулировали в NLB. В каждый момент времени от каждого животного выбирали колонии (пять животных × три момента времени). В случае RCS от каждого животного в определенный период времени собирали пять колоний. В среде LPSA наблюдались образование меньшего числа колоний и разнообразие видов и количества колоний в чашках Петри для каждой пары животное - момент времени. Из среды NLA были выбраны две колонии/животное - момент времени, исключено было животное 2107 в момент времени 18 ч. Для этого случая были собраны шесть колоний из-за видимого их разнообразия. Не во всех инокулированных пробирках наблюдался рост бактерий после инкубации.

Содержимое пробирок, в которых наблюдался рост, делили на две отдельные

Аликвоты 9 мл и 1 мл. Аликвоту 1 мл использовали для выделения ДНК при помощи набора High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Аликвоту 9 мл помещали в стерильную пробирку (15 мл) Falcon и центрифугировали до образования твердой гранулы. Затем эту гранулу воссоздавали в средах NLB или RCS, содержащих 10% глицерина. Воссозданный образец хранили до использования при температуре, равной -80°C. Экстрагированную ДНК затем использовали для анализа изолятов методом RAPD-PCR с целью определения филогенетических взаимосвязей. Анализ проводили с помощью базы данных Bio-Numerics (Applied Maths Inc., Austin, TX) для определения сходства изолятов, используя характер исчерченности RAPD DNA. Коэффициент подобия изолятов определяли при помощи коэффициента Дайса и метода невзвешенных парных групп. Для того, чтобы сгруппировать 109 изолятов в 65 отдельных кластеров, применяли коэффициент подобия равный 80% или больше. Из 65 кластеров 23 росли только в RCS, 11 росли только в среде LPSA, 14 росли только в среде NLA, 4 кластера росли и в RCS, и в LPSA, 6 кластеров росли и в RCS, и в NLA, 3 кластера росли и в LPSA, и в NLA и 4 кластера находились во всех трех средах.

Проводил слот-блот-гибридизацию с помощью прибора Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (BIO-RAD; Hercules, CA). Выбирали геномную ДНК одного изолята в кластере как представляющую этот кластер и блоттировали на мембранах. Пробы для гибридизации готовили с помощью набора PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany). Пробы выбирали на основе анализа клонированных вставок, они состояли из четырех клонированных вставок (клоны 79, 84, 94 и 110) из SSH 10. До проведения гибридизации собирали меченые пробы. Гибридизацию проводили при температуре 45°C в течение 5 ч. В течение ночи давали развиваться колориметрическим реакциям на мембранах. В тридцати из 37 изолятов (кластеров) на RCS мембране происходила гибридизация, о чем свидетельствовала колориметрическая реакция, в 25 из 28 изолятов гибридизация происходила на LPSA/NLA мембране.

Изоляты, в которых происходила гибридизация, подготавливали для секвенирования гена 16S рРНК. Вкратце, ген 16S рРНК каждого из 55 изолятов амплифицировали методом GWH (PCR) с применением праймеров 8F (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG) и 1406R (ACGGGCGGTGTGTRC). Продукт ПЦР очищали при помощи набора для очистки QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA). Очищенный продукт анализировали методом гелевого электрофореза. Когда получали достаточное количество продукта, очищенный образец помещали на лед на ночь для проведения секвенирования за один проход (Lark Technologies, Houston, TX). Последовательности с геном 16S из каждого кластера сравнивали с последовательностями в базе данных NCBI, используя функцию Blastn. Нужные организмы, выявленные при таком сравнении, состояли из штамма 8G-1 *Enterococcus faecium*, штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* и штамма 8G-134 *Bacillus pumilus*.

40 Пример 2

Испытание штаммов *in vitro*

Содержимое рубца для испытаний *in vitro* отбирали у двух годовалых телок породы Херефорд (Hereford). Телок идентифицировали по меткам на ушах, они имели номера 101 и 133. Телки получали корм в количестве 6 ф/голову/день, корм представлял собой высушенное зерно дистилляторов. Животные также имели свободный доступ к сенажу.

Требования протокола испытаний соблюдались как можно точнее, чтобы избежать ошибок. Содержимое рубца отбирали от каждой телки и помещали в маркированные предварительно нагретые термосы. Термосы транспортировали для обработки в Agtech

Products, Inc. Дубликаты образцов содержимого рубца помещали во флаконы, содержащие буфер McDougall и 3% глюкозы (конечная концентрация глюкозы после получения объема смеси буфера McDougall и содержимого рубца равного 180 мл), и нагревали до 39°C. Возможные штаммы DFM штамм 8G-1 *Enterococcus faecium*, штамм 8G-73 *Enterococcus faecium* и штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*, добавляли во флаконы с дозой $1,0 \times 10^7$ кое/мл (конечная концентрация). Испытания проводили с четырехкратной повторностью, взяв за единицу измерения флакон. Испытания проводили на контрольных образцах (добавлена глюкоза, но не вводили DFM), штаммах 8G-1 *Enterococcus faecium*, 8G-73 *Enterococcus faecium* и 8G-134 *Bacillus pumilus*. Флаконы промывали CO₂ и закрывали. Они находились во встряхиваемой водяной бане при температуре 39°C и скорости перемешивания 140 об/мин. Примерно за 10 мин до отбора проб из флаконов отводили воздух для выпуска газов, являющихся побочными продуктами ферментации. Образец содержимого рубца отбирали из каждого флакона в начале и каждые 6 ч до истечения 36 ч. Определяли величину pH и содержание летучих жирных кислот и записывали эти данные. Проводили статистический анализ повторных измерений для определения действия DFM во времени или односторонний анализ вариантности ANOVA для определения действия DFM в конкретные моменты времени.

Основной задачей *in vitro* опытов с рубцовой жидкостью было определение возможности положительного влияния возможных штаммов DFM, штамма 8G-1 *Enterococcus faecium*, штамма 8G-73 *Enterococcus faecium* и штамма 8G-134 *B. pumilus*, на процесс ферментации в рубце в условиях избытка энергии. К каждому образцу рубцовой жидкости добавляли *in vitro* избыток глюкозы для введения животным легкоусвояемого углевода. Как показано на Фигуре 3, добавление каждого из этих штаммов - кандидатов значительно повышает утилизацию глюкозы во времени ($P=0,0001$). По сравнению с контрольными образцами (Фигура 4) добавление DFM - кандидата к стимулируемой *in vitro* модели оказывало сильное влияние на образование молочной кислоты во времени ($P=0,0025$). В момент времени 36 ч количество молочной кислоты в случае *B. pumilus* было на 17% меньше, а при введении обоих штаммов-кандидатов *Enterococcus* - на 32% меньше.

Определение содержания летучих жирных кислот проводили методом HPLC. Общее содержание VFA (ацетат + пропионат + бутират) значительно изменялось при добавлении штаммов *Enterococcus* ($P=0,0279$) (Фигура 5). Оказалось, что штаммы-кандидаты 8G-1 и 8G-73 *Enterococcus* повышают общее содержание VFA во времени. В то же время не было отмечено значительного влияния *B. pumilus* на процесс образования VFA в целом.

Результаты, полученные *in vitro*, показали, что возможные DFM, штаммы 8G-1, 8G-73 и 8G-134, положительно влияли на процесс ферментации корма в рубце за счет повышения степени утилизации глюкозы без соответствующего повышения содержания молочной кислоты по сравнению с контрольными образцами. Избыток глюкозы в рубце обычно быстро усваивается с образованием молочной кислоты. Именно накопление молочной кислоты вызывает острый приступ ацидоза. За счет утилизации глюкозы без сопутствующего образования молочной кислоты DFM - кандидаты могут уменьшать вредное воздействие ацидоза. *In vitro* модель рубца позволяет предположить, что указанные штаммы способны успешно модулировать избыток энергии в рубце у скота, которому скармливают большие количества легко усвояемых углеводов.

Пример 3

Испытание возможных DFM на животных, получающих корм с легко усвояемыми углеводами - стимуляция острого ацидоза

Материалы и методы

Животные и распределение по загонам

На местных скотных дворах покупали двадцать кроссбредных бычков-кастратов, предназначенных для убоя. Животных содержали в исследовательском центре в течение двух недель до начала исследования для выявления случаев заболеваемости и смертности. Животных группировали по весу по случайной схеме. В загон помещали пять животных и проводили им один из четырех курсов лечения. Животные в каждом из трех загонных получали разные DFM, как указано ниже, животным в четвертом загоне не давали DFM (контроль). Схема лечения показана в Таблице 2 ниже.

Номер загона	Вид лечения в загонах		
	Возможный DFM(TX)	Минимальная доза (кое/голову/день)	Идентификация гена 16S рРНК
1	Нет	0	Нет (контроль)
2	8G-1	5×10^{10}	Enterococcus spp.
3	8G-73	5×10^{10}	Enterococcus spp.
4	8G-134	5×10^9	Bacillus pumilus

Дневной рацион для всех групп животных до начала стимулирования состоял из 62,5% грубого корма, 30% дробленой кукурузы и 7,5% белковой добавки (Таблица 3 ниже). Протеиновая добавка включала монензин (Rumensin®) в количестве 375 мг/голову/день. Белковая добавка содержала также тилозин фосфат (Tylan®).

Состав рациона для стимулирования ацидоза		
	Ингредиент	% DM в корме
Корм до начала исследования	Измельченное сено	62,5
	дробленая кукуруза	30
	Steakmaker® К + 45-25 R 500 Т 180*	7,5
		87,4
Корм для стимулирования ацидоза	обработанные паром кукурузные хлопья	5,1
	гранулы альфальфа	7,5
	Steakmaker® К + 45-25 R 500 Т 180*	

* Оба рациона содержат Rumensin и Tylan.

Животные получали кормовой рацион в количестве 15 ф/голову/день один раз утром, оставшийся корм сдвигали к стойловой раме поздно вечером. За 14 дней до голодания животным скармливали DFM - кандидаты в дозах, указанных в Таблице 2 выше, в виде подкормки к дневному рациону.

Штамм 8G-134 *Bacillus pumilus* скармливали в дозе 5×10^9 кое/голову/день. Кандидаты 8G-1 и 8G-73 *Enterococcus* добавляли в дозе 5×10^{10} кое/голову/день.

Получение DFM-кандидатов

Штаммы - DFM-кандидаты, отобранные для опыта, представляли собой штаммы 8G-1 и 8G-73 *Enterococcus* spp. и штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*. Штаммы хранили при температуре, равной -80°C . Каждую культуру инокулировали в пробирках 10 мл в бульонах, содержащих MRS (Man, Rogosa and Sharp) или TSB (трипсиновый соевый бульон). Пробирки с бульоном инкубировали в течение 24 ч при температуре, равной 32°C и 37°C для *Bacillus* и *Enterococcus*, соответственно. Культуры помещали в соответствующую среду, содержащую агар, и инкубировали. Выделенную колонию собирали в 10 мл бульона и давали ей расти в логарифмической фазе роста (18-24 ч),

затем ее помещали в свежий бульон (10% об/об). Штаммы *Enterococcus* выращивали при температуре 37°C в бульоне MRS. Штамм *Bacillus* выращивали во встряхиваемом инкубаторе при скорости 130 об/мин при температуре 32°C в расположенных горизонтально пробирках с TBS. Для роста *Enterococcus* 2 мл помещали во флакон (250

5 мл), содержащий 198 мл бульона, и инкубировали в течение 18 ч.

200 мл культуры инокулировали в сосуде (2 л), содержащем 1,8 л бульона и инкубировали в течение 18 ч. В случае *Bacillus* 5 мл помещали в сосуд объемом 250 мл, содержащий 50 мл TBS, и затем инкубировали при 32°C во встряхиваемом инкубаторе (130 об/мин) в течение 24 ч. 50 мл использовали для инокуляции в 1 л сосуде, содержащем

10 600 мл и инкубировали еще в течение 24 ч.

Оптическая плотность (OD) 18-часовой культуры кандидатов - *Enterococcus* определялась перед сбором клеток. Величину OD сравнивали с соответствующими величинами на ранее построенных кривых роста, чтобы определить кое/мл культуры. Образцы высевали на чашки Петри для подсчета и генетического фингерпринтинга.

15 Методом RAPD - PCR анализа контролировали качество выращивания. Из расчета на минимальную дозу кандидатов - *Enterococcus* равную $5,0 \times 10$ кое/голову/день рассчитанное количество культуры помещали в бутылку для центрифугирования компании Nalgen и центрифугировали со скоростью 4500 об/мин в течение 10 мин при температуре, равной 4°C. Минимальная концентрация кандидата - *Bacillus* равнялась

20 $5,0 \times 9$ кое/голову/день, 100 мл культуры *Bacillus* центрифугировали так же, как *Enterococcus*. Выгружали надосадочную жидкость. Осадок снова суспендировали в 30 мл среды для роста, содержащей 10% глицерина. Этот объем помещали в конический сосуд объемом 50 мл. Бутылки для центрифугирования промывали затем 10 мл

25 питательного бульона и помещали жидкость в тот же конический сосуд. На все сосуды наклеивали ярлыки с указанием вида штамма, даты, когда был собран штамм - кандидат и номера посева. Число колоний при посеве на чашках Петри использовали для определения общего количества колониеобразующих единиц в каждом сосуде. Содержимое сосудов соединяли до доставки колоний в количестве минимум $5,0 \times 10$ кое/голову/день в случае кандидатов - *Enterococcus* и $5,0 \times 9$ кое/голову/день в случае кандидат

30 - *Bacillus*. Все конические сосуды замораживали при температуре -20°C.

Стимулирующий корм и фаза сбора рубцовой жидкости

Образцы рубцовой жидкости получали от отдельных животных путем интубации при помощи трубки, снабженной фильтром и присоединенной к источнику вакуума через вакуумную колбу. После отбора рубцовой жидкости сразу же измеряли величину

35 рН и замораживали образцы для транспортировки в Agtech Products Inc. для анализа VFA. Образцы отбирали у всех животных в моменты времени -12 ч, +6 ч, +10 ч, +14 ч, +18 ч, +22 ч, +30 ч, +36 ч и +48 ч, при этом момент времени 0 ч является временем начала стимулирования. Весь корм для животных убирали в момент времени -24 ч для проведения стадии голодания, чтобы побудить животных начать жадно поглощать

40 стимулирующий корм в момент времени 0 ч.

Животные во всех загонах голодали в течение 24 ч до получения кормового концентрата (момент времени 0 ч). Концентрат состоял из 28 ф обработанных паром кукурузных хлопьев (Таблица 3 выше). Стимулирующий рацион скармливали в количестве 20 ф/голову. Визуально отслеживали потребление этого рациона и добавляли

45 дополнительное количество корма по необходимости.

Образцы рубцовой жидкости собирали каждые 4 ч у всех животных, начиная от +6 ч до +22 ч. Каждый образец использовали для определения величины рН сразу же после отбора. Затем рубцовую жидкость замораживали и транспортировали в Agtech Products

Inc. для определения количества VLA методом HPLC. Для определения величин рН, количества VFAs и уровня глюкозы проводили анализ повторных измерений, используя каждое отдельное животное в качестве единицы наблюдения. Проводили парное сравнение во времени каждого DFM - кандидата в загонах и контрольных образцов для определения эффективности кандидатов при изменении механизма ферментации в рубце.

Результаты и обсуждение

Двадцать голов кроссбредного мясного скота со средним весом 731,95 ф группировали по случайной схеме во время лечения таким образом, чтобы не было значительной разницы по весу между животными в этих группах (Таблица 4). В трех загонах проводили курсы лечения, а в одном загоне были контрольные животные (5 голов/загон). Вид лечения в загоне указан в Таблице 2 выше.

Схема лечения животных в загонах				
Номер загона	Лечение	Число животных	Средний вес животного в ф (SD)	Средняя величина потребления бычком корма ¹ (% от веса)
1	Контроль	5	731,6 (79,94)	4,8
2	8G-1	5	741,2 (94,03)	3,9
3	8G-73	5	731,6 (70,12)	3,7
4	8G-134	5	727,6 (72,71)	3,6

¹ Средняя величина потребления корма бычком была рассчитана в % от средней величины веса бычка в данном загоне.

Животным давали стимулирующий рацион в момент времени 0 ч и отбирали пробы рубцовой жидкости в обозначенные моменты времени для определения величин степени ферментации в рубце. Среднее количество потребленного корма/голову в загоне рассчитывали в %% от средней величины веса бычков в этом загоне (Таблица 4 выше). В контрольном загоне (загон №1) наблюдалось самое большое потребление корма по сравнению с животными в других загонах, которым скармливали лекарство (4,8% от веса бычка). Наименьшее количество корма потребляли бычки в загоне №4 (около 3,6% от веса бычка). Животные во всех загонах в среднем должны были потреблять около 5,625 ф концентрата в день как часть корма до стимуляции, что в среднем составило бы 0,8% от средней величины веса бычков. Несмотря на разницу в потреблении стимулирующего корма в загонах эта разница была не больше, чем увеличение потребления концентрата из рациона до стимуляции, и не являлась причиной отличий в величинах степени ферментации, характерных для каждого загона.

Через 24 ч корм убрали и давали в неограниченном количестве луговое (степное) сено. Это делали для предосторожности, чтобы не происходило непрерывного снижения величины рН в рубцовом содержимом. Добавление сена должно стимулировать дополнительное жевание и способствовать буферизации рубцовой жидкости. Несмотря на добавление сена величина рН в рубцовой жидкости продолжала снижаться.

Сразу же после сбора рубцовой жидкости определяли величину рН образца. Во всех группах, где проводилось лечение происходило уменьшение величины рН, что видно на Фигуре 6. Величина рН у животных контрольной группы достигала наименьшего значения в момент времени 30 ч и начинала после этого постепенно повышаться. В последнем отобранном образце средняя величина рН для животных в контрольном загоне была сильнокислой (рН 4,94). Острый ацидоз связан с величиной рН ниже 5,6 (Owens et al., 1998). Более высокие величины наблюдались в случае штаммов 8G-1, 8G-73 и 8G-134, скармливаемых бычкам в загонах 2, 3 и 4, по сравнению с контролем от момента времени +22 ч до момента +48 ч. Это позволяет предположить, что животные

в этих загонах, получавшие возможные DFMс, восстанавливались после стимулирования ацидоза быстрее. Средняя величина рН в содержимом рубца и животных, которым давали штаммы 8G-1, 8G-73 и 8G-134 в момент времени +48 ч, составляла 5,96, 6,02 и 6,14 соответственно, что превышает величину рН у контрольных животных более чем на одну единицу. Метод анализа повторных измерений показателей для этих трех штаммов во времени не выявил значительной разницы при сравнении с контролем. Однако, когда сравнивали величины рН для животных, получавших 8G-1, 8G-73 и 8G-134, с контролем в промежутке от +22 ч до +48 ч, разница была значительной или почти значительной ($P=0,1562$, $0,0965$ и $0,0466$ для 8G-1, 8G-73 и 8G-134, соответственно).

Средние профили молочной кислоты для всех групп, которым вводили штаммы, представлены на Фигуре 7. Максимальная средняя концентрация молочной кислоты в рубцовой жидкости контрольных животных через 30 ч после получения сенсibiliзирующего (стимулирующего) рациона была равна 105 мМ. Штаммы-кандидаты DFM 8G-1, 8G-73 и 8G-134 снова приводили к получению средней численной разнице в содержании лактата в рубце животных, получавших эти штаммы, и контрольных животных. Средняя концентрация молочной кислоты в рубце контрольных животных и животных, которым вводили штамм 8G-1 в первые 14 ч стимулирования, была похожей. Последующее увеличение этой величины было гораздо меньше у животных, получавших штамм 8G-1, хотя разница не была значительной ($P=0,1892$). У животных, которым вводили штамм 8G-73, наблюдались более низкие концентрации молочной кислоты в момент времени 30 ч, они оставались ниже концентраций у контрольных животных в течение дальнейшего опыта. Штамм-кандидат 8G-134 также приводил к получению сниженных концентраций молочной кислоты с момента времени +22, эти величины были все время меньше величин у контрольных животных в течение 48 ч.

Были определены и проанализированы величины концентраций VFAs. Концентрации летучих жирных кислот (VFA) увеличивались у контрольных животных и животных, которым вводили штаммы 8G-73 и 8G-134, и достигали максимального значения в момент времени 6 ч (Фигура 8). Через 6 ч у животных, которым вводили штаммы, уровень всех VFA (ацетат, пропионат и бутират) снижался. Между этими величинами у животных, получавших штаммы, и у контрольных животных не было значительной разницы. Однако введение штамма 8G-1 привело к задержке в уменьшении содержания VLA, которая не возникала до +14 ч. С течением времени опыта значительной разницы в величинах концентраций всех VLA или отдельных VFA (ацетат, пропионат или бутират) не наблюдалось.

В дополнение к мониторингу и измерениям параметров ферментации в рубце животных во время изучения процесса ацидоза наблюдали за видимыми клиническими эффектами, связанными с ацидозом. В начале процесса стимулирования ацидоза (от 0 ч до +14 ч) последствия применения стимулирующего корма были минимальными. У животных не наблюдались признаки депрессии, они продолжали потреблять стимулирующий корм. Через 22 ч после получения стимулирующего корма у всех животных (кроме тех, кому вводили 8G-1) были отмечены болезненные ощущения, признаки депрессии и неоформленный жидкий кал. Животные в загоне №2 больше не ели корм, но не имели клинических симптомов, несмотря на снижение величины рН.

Острый ацидоз рубца по определению характеризуется снижением величины рН содержимого рубца до уровня, вредного не только для функции рубца, но также и для здоровья домашнего скота. Острый ацидоз характеризуется накоплением молочной кислоты и уменьшением концентрации VFA. Функция рубца состоит в комбинации

поддержания источника энергии и наличия азотсодержащих компонентов, обеспечиваемых кормом. Когда возникает дисбаланс в метаболизме в рубце, обычно следует расстройство пищеварения, оно может проявляться в виде ацидоза. При проведении данного опыта штаммы 8F-1, 8G-73 и 8G-134 способствовали восстановлению функции рубца, о чем свидетельствуют параметры ферментации в рубце.

Животные, которым вводили штамм 8G-1, *Enterococcus faecium*, в среднем восстанавливались от ацидоза быстрее, что показывают восстановление величины рН и уменьшение концентрации молочной кислоты. Помимо этого животные, которым скармливали кандидат-штамм 8G-1 не проявляли клинических признаков, связанных с ацидозом,

Кандидат штамм 8G-73, *Enterococcus faecium*, улучшал ферментационные процессы в рубце во время опыта. Средние величины концентрации молочной кислоты были самыми низкими из всех показателей для трех штаммов-кандидатов в момент времени +48 ч (12,54 мМ). Обеспечивалось соответствующее увеличение величины рН до 6,02, что было выше величины рН у контрольных животных на 1,08 ед. рН.

Кандидат-штамм 8G-134 *Bacillus pumilus* также приводил к восстановлению функции рубца во время стимулирования ацидоза. Средняя концентрация молочной кислоты у животных, получавших штамм 8G-134, достигала пикового значения, равного 89 мМ в момент времени +22 ч, в то время как эта величина у контрольных животных продолжала расти и была равна 105 мМ в момент времени +30 ч. Средняя величина концентрации молочной кислоты снижалась до 57 мМ в момент времени +30 ч. Наряду с накоплением молочной кислоты величина рН в рубцовом содержимом скота, получавшего штамм 8G-134, восстанавливалась быстрее, чем у контрольных животных и значительно отличалась в период от +22 ч до +48 ч ($P=0,0466$).

Пример 4

Существо

Тридцать первородящих и многородящих коров были сгруппированы по стадиям лактации и по признаку прогнозируемой продуктивности (РРА) и им назначали один из трех курсов лечения. Десять коров было в каждой группе, одна контрольная группа (курс 1) получала полный смешанный кормовой рацион (ТМР), группа 2 (курс 2) и группа 3 получали полный смешанный рацион ТМР с введением штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* в дозе 5×10^9 кое/голову/день и 1×10^{10} кое/голову/день, соответственно, в промежутке от 3 нед в предродовом периоде до 22 нед в послеродовом периоде. Основная цель состояла в определении воздействия штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* на продуктивность дойных коров и их характеристики по сравнению с контрольными животными в указанный промежуток времени. Другая цель заключалась в определении наличия эффекта дозы при введении штамма 8G-134 *Bacillus pumilus*. Введение этого штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* приводило к значительному увеличению производства молока, к повышению содержания жира в молоке и снижению количества соматических клеток. Это действие штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* не происходит за счет состояния коровы, веса животного, увеличения усвоения сухого вещества или значительного изменения профиля метаболитов в крови, следовательно, штамм 8G-134 также оказывает благоприятное воздействие на молочных коров.

Материалы и методы

Домашний скот

Тридцать коров голштинской породы распределяли по случайной схеме на три группы и назначали каждой группе один из курсов лечения в период непрерывной

лактации, начиная от 3 нед до отела в течение 22 нед в послеродовой период. Не было значительной разницы между величинами выхода молока в более ранний период у коров второго отела и коров с большим числом отелов и между прогнозируемой продуктивностью (РРА) при первой лактации у коров в разных группах. Количество коров первой и второй лактации в разных группах несколько отличалось, но это не влияло на среднюю продуктивность, так как лактация оценивалась в статистической модели. Животных исследовали в промежуток от примерно 3 нед в предродовом периоде до 22 нед в послеродовом периоде.

Питание

Ингредиенты корма и состав полного смешанного рациона (ТМР) представлены ниже в Таблице 5 для яловых и лактирующих коров, соответственно. Основа ТМР была одинаковой для двух групп и корма отличались подкормкой. Каждая группа получала в качестве подкормки 8 унций мелкоизмельченной кукурузы, к которой добавляли 1 унцию мальтодекстрина (курс 1, контроль), *Bacillus spp.* с дозой 5×10^9 кое/голову/день (курс 2) и *Bacillus spp.* с дозой 1×10^{10} кое/голову/день (курс 3).

Таблица 5.		
Состав ТМР для яловых и лактирующих коров		
	Яловые коровы	Лактирующие коровы
Ингредиенты, % DM		
Кукурузный силос	52,57	39,14
Силос ржи	18,54	
Сенаж альфаalfa		16,52
Злаковое сено	14,45	1,77
SBM48	5,74	10,77
Кровяная мука	4,41	
AminoPlus		6,01
Кукуруза	2,41	21,07
Жир	0,65	1,42
Известняк		1,26
Бикарбонат натрия		0,84
MagOx	0,65	0,42
Соль	0,32	0,53
TMin Vit	0,27	0,26
Состав, % DM		
CP	16,50	16,64
SP, % CP	32,29	28,58
NDF	41,06	30,65
Крахмал	19,56	29,82
Сахар	3,19	2,68
NFC	33,47	41,87
Жир	3,82	4,15
Ca	0,31	0,87
P	0,29	0,34
Mg	0,54	0,42
K	1,72	1,33
NeL, мкал/кг	1,60	1,74

Отбор образцов и получение данных

Образцы корма (ТМР) отбирали ежедневно (регистрали случаи отказа от корма) и еженедельно смешивали, эти еженедельные смеси ежемесячно соединяли и ежемесячные смеси анализировали на содержание сухих веществ (DM), сырого протеина (CP), кислых по реакции детергентных белковых волокон (ADF-CP), нейтральных детергентных белковых волокон (NDF-CP), растворимого белка (SP), кислого детергентного волокна

(ADF), нейтрального детергентного волокна (NDF), лигнина, жира, крахмала, сахара, золы, кальция (Ca), фосфора (P), магния (Mg), калия (K), серы (S), натрия (Na), хлора (Cl), железа (Fe), марганца (Mn), цинка (Zn) и меди (Cu) в Cumberland Valley Analytical Services, Maugansville MD.

5 Коров доили два раза в день, объем молока регистрировался автоматически при каждой дойке, затем эти величины (полученные утром и вечером) суммировались ежедневно. Раз в неделю образцы молока, полученные во время утренней и вечерней дойки, соединялись и анализировались на содержание жира, белка, соматических клеток, нежирных твердых веществ, азота в мочеvine молока (MUN) в лаборатории Dairy One
10 milk в State College, PA с применением метода Fossomatic 4000 (FOSS; Eden Prairie, MN).

Опыт с животными проводили в течение 3 нед дородового периода и 22 нед послеродового периода. Вес животных определяли по обхвату груди в 1, 3, 7, 11, 15 и 18 недели послеродового периода. Состояние тела оценивалось двумя независимыми наблюдателями в то же время, когда определяли вес животных. Образцы крови отбирали
15 из копчиковой вены, собирали сыворотку и анализировали ее на содержание глюкозы, бета-гидроксibuтирата (BHB) и неэтерифицированных жирных кислот (NEFA) во 2-ю и 8-ю неделю послеродового периода. Содержание глюкозы и BHB определяли с использованием прибора Abbott Precision Xtra™ meter (Abbott Diabetes Care Inc., Alameda, CA). Для определения содержания неэтерифицированных жирных кислот в сыворотке
20 крови применяли набор Randox assay kit (Cat. HN 1530, Randox Laboratories, Northern Ireland) и проводили фермент-связанный иммуносорбционный анализ (ELISA) множества образцов с использованием планшет-ридера при длине волны 550 нм.

Набор Randox использует ацил-CoA-синтетазу и ацил-CoA-оксидазу для превращения NEFA в 2,3-транс-еноил-CoA плюс перекись. Перекись плюс N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-м-толуол приводит к получению продукта пурпурного цвета, который
25 представляет собой индикатор концентрации NEFA в сыворотке.

Статистические модели

Выход молока и его состав, вес и состояние тела по шкале оценки состояния тела коровы анализировали, используя статистический пакет программ SAS. Повторяющимся
30 субъектом была корова с набором ковариантных матриц структуры корреляции. Данные ежедневного анализа молока объединяли за неделю в послеродовом периоде. Применяли следующую статистическую модель:

$$Y_i = \mu_i + TRT_j + Lact_k + Week_1 + TRT_j * Lact_k + TRT_j * Week_1 + TRT_j * Lact_k * Week_1 + e_{ijklm}$$

где

35 Y_i = наименьшая средняя величина квадрата переменных, зависимых от продуктивности;

μ_i = общее среднее число различных переменных;

TRT_j = эффект от j^{th} курса, 1, 2, 3;

40 $Lact_k$ = k^{th} лактация, 1, 2+;

$Week_1$ = 1-я неделя, 1..22;

члены, характеризующие взаимодействие ($TRT_j * Lact_k + TRT_j * Week_1 + TRT_j * Lact_k * Week_1$)

e_{ijklm} = ошибка.

45 Ежемесячные образцы TMR и случаи отказа от пищи для каждого курса лечения анализировали для определения разницы, используя методику SAS.

Величины концентрации глюкозы, BHB и NEFA анализировали, применяя общие линейные модели в компьютерной программе SAS. Переменными были корова, неделя

и курс лечения. Лечение проводили для коровы и применяли параметр ошибки для определения значимости лечения. Лечение в течение недели анализировали на статистическую значимость, используя остаточную ошибку.

Результаты

5 Средний состав TMR используемого в течение опыта для яловых и лактирующих коров представлен в Таблице 6. Состав для разных групп животных был одинаковым.

Таблица 6.				
Состав TMR для яловых коров и лактирующих коров				
	Компонент, % сухого вещества			
Ингредиент	1	2	3	SEM
TMR для яловых коров				
N	3	3	3	
CP	13,64	13,17	13,11	0,14
ADF	29,55	28,37	27,88	0,53
NDF	48,54	48,04	47,14	0,93
Лигнин	3,64	3,52	3,58	0,09
Крахмал	18,74	18,19	17,97	0,87
Сахар	6,71	6,15	6,57	0,23
Зола	8,44	7,56	7,79	0,10
NFC	39,49	36,93	38,20	0,86
Ca	0,49	0,46	0,47	0,01
P	0,37	0,35	0,35	0,004
TMR для дойных коров				
N	9	9	9	
CP, %	14,54	14,81	14,37	0,10
ADF, %	21,54	21,38	21,64	0,25
NDF, %	33,51	33,21	33,30	0,32
Лигнин, %	3,27	3,27	3,26	0,06
Крахмал, %	25,36	26,52	25,48	0,38
Сахар, %	6,25	6,15	6,25	0,15
Жир, %	3,69	3,65	3,62	0,04
Зола, %	8,73	8,67	8,60	0,09
NFC, %	41,22	42,02	41,44	0,34
Ca, %	0,95	0,97	0,96	0,005
P, %	0,36	0,36	0,36	0,003
SEM, стандартная ошибка				
NFC, неволокнистый углевод				
NDF, нейтральное детергентное волокно				
ADF, кислое детергентное волокно				
35 Курс 1 контроля; курс 2, <i>Bacillus pumilus</i> в дозе 8G-134 5×10^9 ; курс 3, <i>Bacillus pumilus</i> 8G-134 в дозе 1×10^{10} .				

Одна корова в контрольной группе (курс 1) давала аномальное количество молока, этот показатель не учитывали при проведении анализа. Анализ молока проводили на образцах от 29 коров. На продуктивность коров введение штаммов оказало большое влияние (Таблица 7 внизу). Коровы, которым скармливали штамм 8G-134 *Bacillus pumilus* в дозе 5×10^9 кое/голову/день (курс 2) и *Bacillus pumilus* 8G-134 в дозе 1×10^{10} кое/голову/день (курс 3), давали гораздо больше молока, чем коровы, которым вводили плацебо. Коровы, прошедшие курс 2 и 3, давали примерно на 2 кг больше молока, чем контрольные (Таблица 7). Наблюдалась большая зависимость от количества отелов в анамнезе. Увеличение продуктивности было значительным у коров с вторым отелом (на 5,2 кг), но у коров с первым отелом значительной разницы в выходе молока не было.

Таблица 7.

Наименьший квадрат средней величины продуктивности голштинских коров от момента появления телят в течение 22 нед постродового периода при введении микробной добавки						
Эффект	Курс	Лактация	Молоко, кг/день	SEM	Разница по сравнению с контролем, кг/день	SEM
5	Курс 0,66	1	33,12 ^a	0,65	0,00	
	Курс 0,60	2	35,38 ^b	0,60	2,30*	
	Курс 0,61	3	35,08 ^b	0,61	1,99*	
10	Лактация 0,47	1	31,59 ^a	0,47	-0,83	
	Лактация 0,39	2	36,84 ^b	0,39	3,09*	
	Эффект взаимодействия					
15		1	32,44 ^a	1,07	0,00	
	1,07					
		2	31,70 ^a	0,93	-0,72	
20		3	31,36 ^a	0,93	-1,07	
	0,93					
		1	33,80 ^b	0,74	0,00	
		2	39,06 ^c	0,76	5,24*	
	0,76					
		3	38,79 ^c	0,79	5,17*	
	0,79					

Среднее значение в группе с различным верхним индексом отличается, $P < 0,05$;

Среднее значение величины разницы с* значительно отличается от 0;

Курс 1 - контроль, курс 2 - 8G-134 *Bacillus pumilus*, 5×10^9 ; курс 3 - *Bacillus pumilus* 8G-134, 1×10^{10} .

Содержание жира в молоке и выход жира указаны в Таблице 8 ниже. Содержание жира в молоке значительно повышалось после проведения курсов 2 и 3 по сравнению с контролем. Выход молока и выход жира возрастали у животных в группе, которым скармливали штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*. Этот штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*, вводимый во время курсов 2 и 3, приводил к значительно более высокому содержанию жира по сравнению с контрольными животными (на 0,24% и 0,31% соответственно) (Таблица 8). В сочетании со значительным ростом выхода молока ежедневный выход жира при проведении курсов 2 и 3 обеспечил значительное ежедневное увеличение количества жира по сравнению с контролем (Таблица 8).

Таблица 8.

Содержание жира в молоке коров						
Процесс	Курс	Лактация	Кол-во жира, %	sem	Выход жира, кг/г	sem
Лечение	1		3,57 ^a	0,09	1,206 ^a	0,042
	2		3,81 ^b	0,08	1,351 ^b	0,039
	3		3,88 ^b	0,08	1,351 ^b	0,039
Лактация		1	3,76	0,06	1,159 ^a	0,030
		2	3,78	0,05	1,395 ^b	0,025

Средние значения с различными верхними индексами, указанные в колонках отличаются по $P < 0,05$;

Курс 1 - контроль; курс 2 - *Bacillus pumilus* 8G-134, 5×10^9 ; курс 3 - *Bacillus pumilus* 8G-134 1×10^{10} .

Баллы по линейно-логарифмической шкале количества соматических клеток (Log SCC) отличались в зависимости от курса и числа лактации. Курсы с введением штамма 8G-134 *Bacillus pumilus* (курсы 2 и 3) обеспечивали более низкие показатели по шкале

оценки, чем контроль (Таблица 9 ниже). Коровы, которым проводили курсы 2 и 3, характеризовались величинами Log SCC равными 4,97 и 4,96, соответственно, а коровы в контрольной группе имели этот показатель равным 5,92. Коровы с двумя родами в анамнезе характеризовались более высокими значениями Log SCC, чем коровы с первой лактацией. Количество соматических клеток связано с инфекцией, а также с иммунологическим статусом и состоянием здоровья лактирующих молочных коров. Кроме того повышенные значения SCC являются показателем воспалительных ответов на инфекцию. Уменьшение величины SCC показало, что коровы, получавшие штамм 8G-134 *Bacillus pumilus*, иммунологически лучше переносят возникновение инфекции во время лактации и характеризуются хорошим состоянием вымени и хорошим здоровьем.

Процесс	Курс	Лактация	Log SCC	Sem
Курс	1		5,92a	0,32
	2		4,97b	0,30
	3		4,96b	0,30
Лактация		1	5,27a	0,23
		2	5,86b	0,19

Log SCC - log количества соматических клеток.
Курс 1 - контроль; курс 2 - *Bacillus pumilus* 8G-134, 5×10^9 ; курс 3 - *Bacillus pumilus* 8G-134 1×10^{10} .

Средние величины DMI для яловых коров и коров в период лактации приведены в Таблице 10 ниже. Потребление сухого вещества корма яловыми коровами колебалось от 10,79 до 11,64 кг/д в разных группах. В период лактации коровы в группах 1, 2 и 3 потребляли 22,02, 21,31 и 21,48 кг/д (Таблица 10). Прогнозируемое DMI, основанное на расчетах NRC, для коров в послеродовой период, показано в Таблице 10. Величина потребления во время курса 1 составляла на 0,83 кг больше прогнозируемой величины; эта величина во время курса 2 была на 1,37 кг меньше прогнозируемой величины; величина потребления во время курса 3 была на 1,04 кг меньше прогнозируемой величины. Увеличение выхода молока при проведении курсов 2 и 3 не сопровождалось повышением DMI. В действительности прогнозируемое или ожидаемое DMI на основе прогноза NRC по сравнению со средней величиной потребления в группе позволяет сделать вывод, что эти коровы потребляли DMI на 1,0-1,5 кг/день меньше. Таким образом, эффективность утилизации DM увеличилась в группах 2 и 3.

Показатель	Группы					
	1	sem	2	sem	3	sem
Потребление сухого вещества, кг/д						
Яловые коровы 0,25	10,79	0,27	11,64	0,25	11,12	
Лактирующие коровы 0,11	22,02	0,11	21,31	0,11	21,48	
Прогноз DMI, кг/д 0,58	21,19	0,58	22,68	0,57	22,52	
Содержание в сыворотке:						
Глюкозы, мг/дл 1,98	53,95	1,98	51,5	1,98	53,5	
Бета-ОН бутират, мг/дл 0,15	1,05	0,15	0,88	0,15	1,15	
NEFA, экв/мл 0,04	0,23	0,04	0,16	0,04	0,17	
Величины в сыворотке в неделю 2,8						
Глюкоза, мг/дл 2,80	52,90	2,80	47,00	2,80	48,90	

2,80	55,00	2,80	56,00	2,80	58,10	
ВНВ, мг/дл	0,92	0,21	0,86	0,21	1,39	
0,21						
0,21	1,17	0,21	0,89	0,21	0,91	
NEFA, экв/мл	0,41	0,05	0,23	0,05	0,28	
0,05						
0,05	0,07	0,05	0,10	0,05	0,07	

ВНВ = бета-гидроксibuтират;
 Курс 1 - контроль; курс 2 - *Bacillus pumilus* 8G-134, 5×10^9 ; курс 3 - *Bacillus pumilus* 8G-134 1×10^{10} .
 Прогноз DMI = $(.372 * FCM + 0,0968 * BWT \text{ (кг)} ^{.75}) * (1 - \exp(-0,192 * (\text{нед.} + 3,67)))$

Разница в величине DMI и продуктивности свидетельствуют, что коровы, которым проводили курс 2 и 3, мобилизуют резервные запасы из тканей организма в большем количестве, чем контрольные коровы, для выработки большего количества молока и потребляют меньше корма, чем ожидалось. Однако содержание NEFA, глюкозы и ВНВ в сыворотке показывает, что эти коровы имеют тот же энергетический статус, что и контрольные коровы (Таблица 10, выше). Кроме того, величины веса и BCS были похожими для животных, получавших *Bacillus*, и для контрольных животных (Таблица 11 ниже). Это свидетельствует о том, что они не мобилизуют больше резервов из тканей организма для образования дополнительного объема молока, что показывает эффективность конверсии корма в организме коров, получавших *Bacillus*, независимо от дозы.

Таблица 11.
 Средние наименьшие квадратичные величины веса (ф) и состояния тела коров в группах. Баллы по шкале оценки состояния тела были средними величинами, полученными от двух наблюдателей

Процесс	Курс	Лактация	Вес (ф)	sem	BCS	sem	
Курс	1		1343,10	28,49	2,92	0,03	
	2		1324,60	27,54	3,13	0,03	
	3		1388,02	27,73	3,06	0,03	
Лактация		1	1223,31	21,87	3,04	0,03	
		2	1476,62	17,94	3,01	0,02	
Различие между видами лечения x лактацию							
		1	1	1170,78	27,72	3,06	0,05
		2	1	1242,64	25,26	3,17	0,05
		3	1	1208,50	24,00	2,94	0,05
		1	2	1486,02	19,33	2,78	0,04
		2	2	1406,42	19,96	3,10	0,04
	3	2	1547,85	20,79	3,19	0,04	

BCS = шкала оценки состояния тела (от 1 до 5 с интервалами 0,25; 1 = истощенное, 2 = тощая; 3 = среднее состояние; 4 = жирная; 5 = ожиревшая.
 Курс 1 - контроль; курс 2 - *Bacillus pumilus* 8G-134, 5×10^9 ; курс 3 - *Bacillus pumilus* 8G-134 1×10^{10} .

Следует иметь в виду, что выше для иллюстрации различных возможных признаков изобретения и различных путей объединения этих признаков описаны различные предпочтительные варианты изобретения. Помимо объединения разных признаков этих описанных вариантов разными путями возможны и другие модификации в объеме данного изобретения. Настоящее изобретение не ограничено предпочтительными вариантами, описанными выше.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Allison, M.J., M. Robinson, R.W. Dougherty, and J.A. Bucklin. 1975. Grain overload in cattle and sheep: Changes in microbial populations in the cecum and rumen. *Amer. J. Vet Res.* 36:181.
 Dunlop, R.H.. 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 16:

259.

Elam, C.J. 1976. Acidosis in feedlot cattle: Practical observations. J. Anim. Sci. 43:898.

Hungate, R.E., R.W. Dougherty, M.P. Bryant, and R.M. Cello. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. Cornell Vet. 42:423.

5 Muir, L.A., E.L. Rickes, P.F. Duquette, and G.E. Smith. 1981. Prevention of induced lactic acidosis in cattle by thiopeptin. J. Anim. Sci. 52:635.

Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D.R. 1998. Acidosis in cattle: a review. J. Anim. Sci. 76:275-286.

10 Slyter, L.L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. J. Anim. Sci. 43:910. Yang, W., 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. Animal Feed Science and Technology, 114(4): 179-193.

Формула изобретения

15 1. Изолированный штамм *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), обеспечивающий улучшение состояния здоровья жвачных животных.

2. Изолированный штамм *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172), обеспечивающий улучшение состояния здоровья жвачных животных.

20 3. Изолированный штамм *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174), обеспечивающий улучшение состояния здоровья жвачных животных.

4. Состав, обеспечивающий улучшение состояния здоровья жвачных животных, включающий:

изолированный штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), штамма *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172),
25 штамма *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174) или их комбинации, и мონензин.

5. Способ улучшения состояния здоровья жвачных животных, включающий введение животному эффективного количества штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), штамма *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172), штамма *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174) и их комбинации.

30 6. Способ по п.5, отличающийся тем, что жвачное животное представляет собой быка, бычка - кастрата, телку, корову или телёнка.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что штамм представляет собой штамм *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), штамм *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172) или их комбинацию, при этом штамм вводится животному в такой дозе, что
35 животное ежедневно получает от 5×10^8 кое/голову/день до 5×10^{10} кое/голову/день.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что штамм представляет собой штамм *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174), и при этом этот штамм вводится животному в такой дозе, что животное ежедневно получает от 5×10^8 кое/голову/день до 5×10^{10} кое/голову/день.

40 9. Способ по п.5, отличающийся тем, что штамм вводится животному, начиная с возраста, равного 30 дней.

10. Способ по п.5, отличающийся тем, что животное представляет собой откормленное на убой животное.

45 11. Способ по п.5, отличающийся тем, что животное представляет собой молочную корову.

12. Способ улучшения состояния здоровья жвачных животных, включающий введение животному комбинации эффективного количества штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), штамма *Enterococcus*

faecium 8G-73 (NRRL B-50172), штамма *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174) и их комбинации, и монензина.

13. Способ получения вводимого жвачным животным микроорганизма, включающий:

5 (а) выращивание в жидкой питательной среде штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), штамма *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172), штамма *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174), и

(б) выделение штамма из жидкой питательной среды.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что он дополнительно включает сушку штамма при замораживании.

10 15. Способ по п.13, отличающийся тем, что штамм представляет собой штамм *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173).

16. Способ по п.13, отличающийся тем, что штамм представляет собой штамм *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172).

15 17. Способ по п.13, отличающийся тем, что штамм представляет собой штамм *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174).

18. Способ получения скармливаемого жвачным животным состава, включающий:

(а) выращивание в жидкой питательной среде штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Enterococcus faecium* 8G-1 (NRRL B-50173), штамма *Enterococcus faecium* 8G-73 (NRRL B-50172), штамма *Bacillus pumilus* 8G-134 (NRRL B-50174),

20 (б) выделение штамма из жидкой питательной среды и

(в) добавление к микроорганизму монензина.

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МЕРЦ, Кейт, Дж.
РЕБЕРГЕР, Томас, Г.

<120> Изолированный штамм, способ его получения, и способ его введения жвачным животным

<130> AGP-34989

<140> 12/629497

<141> 2009-12-02

<150> 61/119,256

<151> 2008-12-02

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический

<400> 1
agagtttgat ymtggctcag

20

<210> 2

<211> 15

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

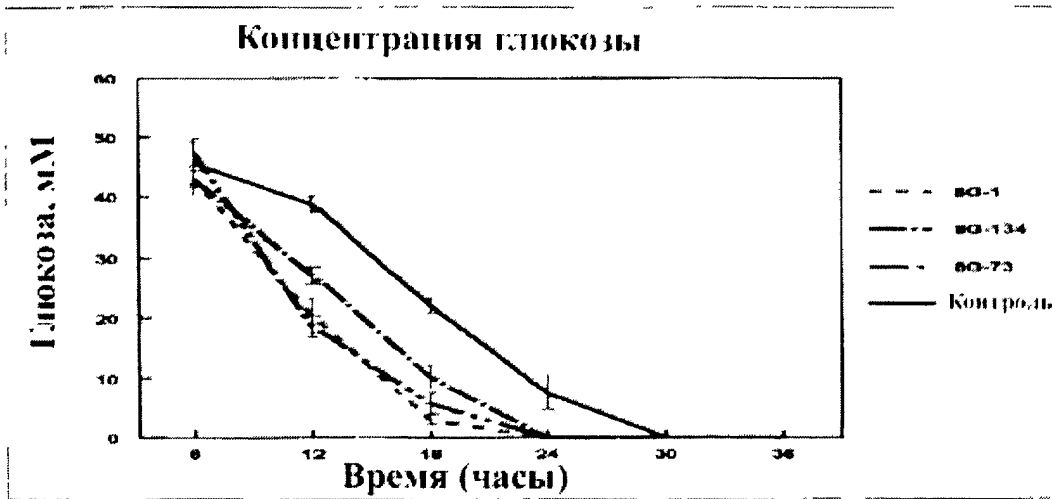
<223> Синтетический

<400> 2
acgggscggtg tgtrc

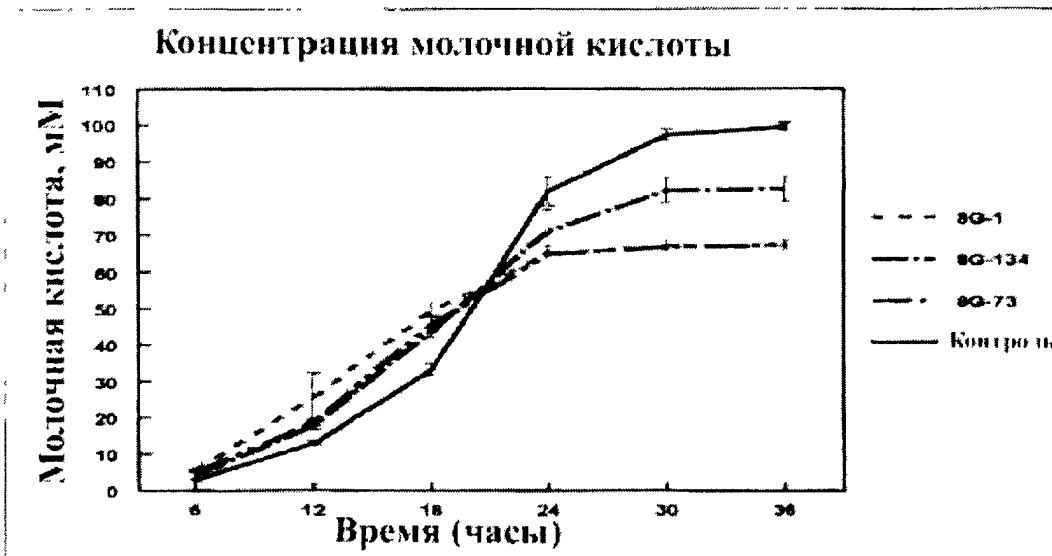
15



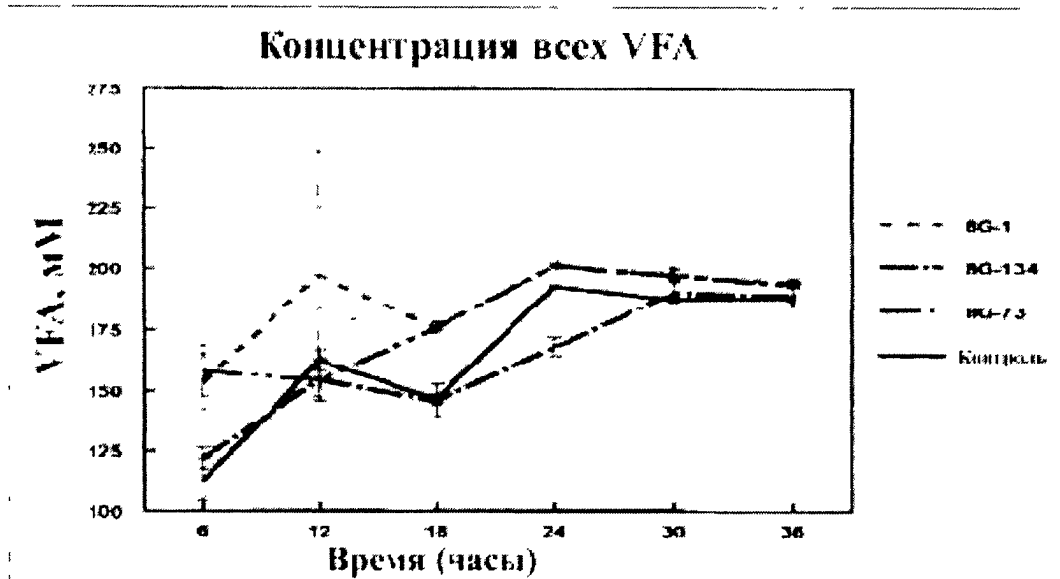
Фиг. 2



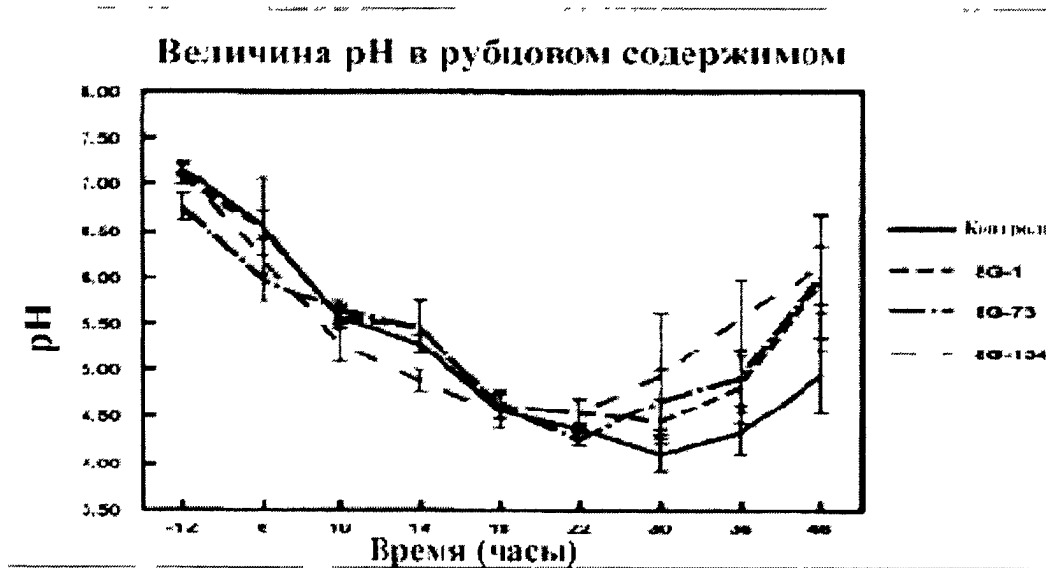
Фиг. 3



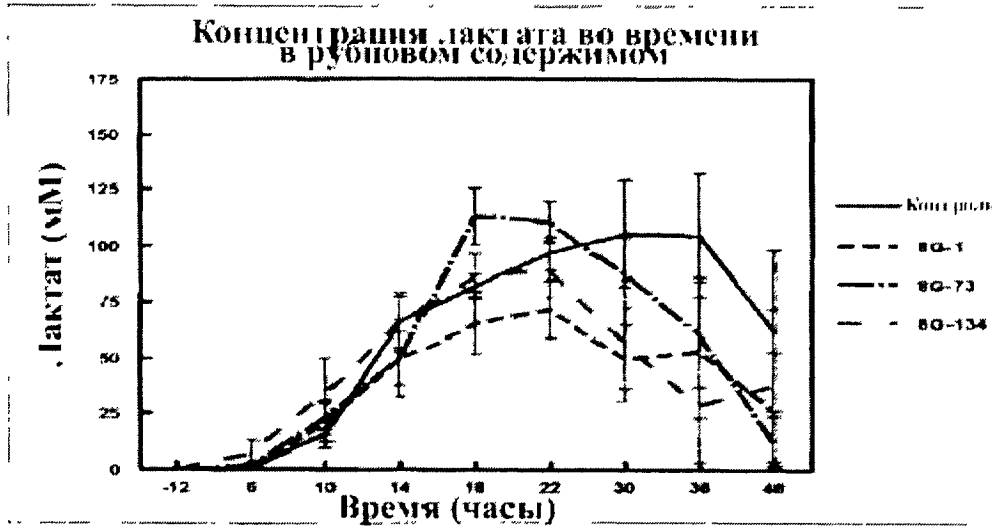
Фиг. 4



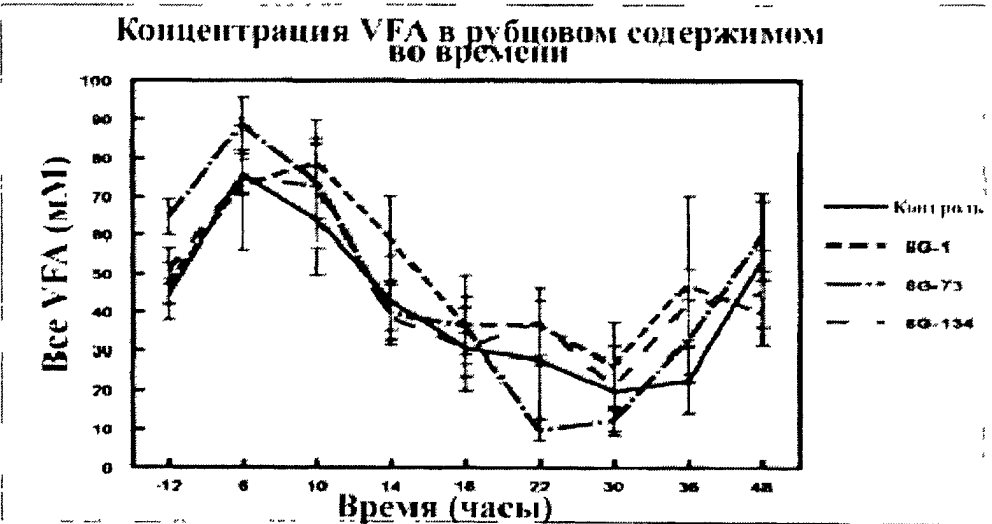
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8