

Применение метода ПЦР-РВ для определения ДНК грибов и бактерий при консервировании зеленой массы люцерны штаммами *Lactocaseibacillus paracasei* и *Lactiplantibacillus plantarum*

Дэниел Мавуена Афордоаньи¹, Шамиль Завдатович Валидов², Ирек Тагирович Бикчантаев³, Евгений Олегович Крупин⁴

^{1,3,4}ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия, tatniva@mail.ru

²Казанский федеральный университет, Казань, Россия, public.mail@kpfu.ru

Аннотация. Новые штаммы *Lactobacillus* (*Lactocaseibacillus paracasei* L1a (L1a) и *Lactiplantibacillus plantarum* S1a R (S1a R)), выделенные из фекалий крупного рогатого скота, использовали в качестве биоконсерванта для силоса из люцерны после идентификации 16S рРНК. Через 62 дня определили содержание грибов в силосе методом ПЦР-РВ с использованием праймеров на основе гена β-актина грибов. Установили, что штаммы L1a и S1a R были способны снижать содержание грибов при силосовании на 93,7 и 95,3 % соответственно по сравнению с контролем. Также было определено общее содержание лактобацилл в силосе. Выявили высокое содержание ДНК молочнокислых бактерий в образцах с L1a (0,00468 нг) и чуть меньшее содержание ДНК в образцах S1a R (0,00245 нг) при уровне в контроле 0,00176 нг. Способность штаммов L1a и S1a R сокращать популяцию грибов и в то же время увеличивать количество молочнокислых бактерий является своего рода показателем их хорошего консервирующего эффекта, а сами штаммы могут быть использованы при производстве биоконсервантов.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, люцерна, силос, микроорганизмы, лактобактерии, грибы, ДНК.

Для цитирования: Афордоаньи Д. М., Валидов Ш. З., Бикчантаев И. Т., Крупин Е. О. Применение метода ПЦР-РВ для определения ДНК грибов и бактерий при консервировании зеленой массы люцерны штаммами *Lactocaseibacillus paracasei* и *Lactiplantibacillus plantarum*. Аграрный научный журнал. 2021. № 10. С. 73–76. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2021i10pp73-76>.

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECNICS

Original article

Application of RT-PCR method for the determination of fungal and bacterial dna in the preservation of green mass of alfalfa with *Lactocaseibacillus paracasei* and *Lactiplantibacillus plantarum*

Daniel M. Afordoanyi¹, Shamil Z. Validov², Irek T. Bikchantaev³, Evgeny O. Krupin⁴

^{1,3,4}Tatar Scientific Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Russia, tatniva@mail.ru

²Kazan Federal University, Kazan, Russia, public.mail@kpfu.ru

Abstract. New *Lactobacillus* strains, *Lactocaseibacillus paracasei* L1a and *Lactiplantibacillus plantarum* S1a R were isolated from bovine feces were used as bioconservants for *Medicago sativa* (alfalfa) silage after 16S rRNA identification. After 60 days the fungal content in the silage was defined by the method of qPCR using primers based on the β-actin gene of fungi. L1a and S1a R were able to reduce fungal DNA after ensilaging by 93.7% and 95.3% respectively in comparison to control. Total lactobacillus content in the silage was also determined and results showed a high DNA content of lactic acid bacteria in L1a samples (0.00468 ng) followed by S1a R samples (0.00245 ng) when compared to control samples (0.00176 ng). The ability of these strains to reduce fungi population and the same time increase Lactic acid bacteria is an indicator for the post-conservation of silage and can be used for bio preparations.

Keywords: RT-PCR, alfalfa, silage, microorganisms, lactobacilli, fungi, DNA.

For citation: Afordoanyi D. M., Validov Sh. Z., Bikchantaev I. T., Krupin E. O. Application of RT-PCR method for the determination of fungal and bacterial dna in the preservation of green mass of alfalfa with *Lactocaseibacillus paracasei* and *Lactiplantibacillus plantarum*. Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal. 2021;(10): 73–76 (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2021i10pp73-76>.

Введение. Серьезной проблемой, затрагивающей качество заготовленного силоса, является присутствие в силосуемой массе патогенных микроорганизмов, вызывающих различные заболевания. Патогенные грибы могут вызывать заболевания у животных непосредственно или опосредованно, за счет синтезируемых ими микотоксинов. Обычно в вегетативной массе растений встречаются грибы *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus* и *Penicillium verrucosum*. Они продуцируют такие микотоксины, как дезоксиниваленол, ниваленол, фумонизины, афлатоксины и охратоксины, которые, как известно, при попадании в организм животных с кормом могут существенно сказаться на их здоровье [1, 2, 3].

Не менее острой проблемой является нехватка белка в рационе крупного рогатого скота. Ее решение требует дополнительного скармливания животным высококачественного силоса из люцерны или дополнительного введения в рацион высокобелковых кормовых добавок. Содержание в люцерне большого количества белка создает благоприятные условия для «заражения» силосуемой массы грибами [4]. С целью ускорения





процессов ферментации зеленой массы люцерны применяют большое количество различных биоконсервантов. Это особенно актуально, так как за последние 20 лет наблюдаются тенденции снижения энергетической питательности заготавливаемого силоса из многолетних трав при некотором улучшении его протеиновой питательности. Это важно и потому, что использование неполноценных кормов в составе рационов кормления впоследствии может привести к целому ряду заболеваний у коров, которые, в свою очередь, могут стать причиной выбраковки животных из стада [5, 6].

Силосование зеленой массы растений с помощью молочнокислых бактерий (МКБ) широко применяется в кормопроизводстве. МКБ различных штаммов в настоящее время наиболее часто используются при создании биоконсервантов. Кислая среда, которая образуется при ферментации простых сахаров в результате метаболизма МКБ, обычно подавляет рост грибов [7]. К интересным свойствам МКБ относятся и иммунорегуляторный эффект, антиоксидантная активность, снижение холестерина и др. [8, 9, 10]. Также известно, что они производят антибиотики, включая бактериоцин и плантарицин, против патогенных бактерий, включая *Salmonella enterica*, *Helibacter pylori*, *E. coli* и *Clostridium spp.* Однако споры грибов в аэробных условиях снова могут быть активными [11, 12].

Проверка качества силоса обычно основана на оценке его органолептических свойств, химического состава и питательности. Не менее важным является определение концентрации грибов и важных пробиотических микробов в силосе наиболее чувствительными современными методами, например ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

В данном исследовании разработаны две пары праймеров для обнаружения общей концентрации ДНК грибов и МКБ в силосе люцерновом, определено их содержание. Это и являлось целью работы.

Методика исследований. В колбу Эрленмейера в фосфатный буфер помещали 1 г фекалий крупного рогатого скота и затем инкубировали в термошейкере при 150 мин^{-1} и 28°C в течение 48 ч. Затем готовили серийные разведения до 10^{-6} и 100 мкл культивировали на агаре Rogosa. Колонии разной морфологии отбирали и культивировали в бульоне Rogosa для идентификации штаммов 16S рРНК. Экстракцию ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Для идентификации выделенных штаммов фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с использованием пары праймеров 27fm (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') и R1522 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3').

Параметры температурного режима были следующими: 95°C в течение 2 мин начальной денатурации, за которыми следовали 35 циклов денатурации при 95°C в течение 15 с, отжиг при 45°C в течение 20 с и элонгация при 72°C в течение 1 мин. Амплифицированные фрагменты разделяли в 1%-м агарозе в $0,5 \times \text{TBE}$. Амплифицированные фрагменты гена 16S рРНК отделяли от сопутствующих продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза в 1%-м агарозе в $0,5 \text{ TBE}$, вырезали и очищали от геля с помощью набора CleanUp Mini (ООО «Евроген», Москва, Россия). Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК определяли в ООО «Евроген» (Москва, Россия).

Поиск сходства в GenBank осуществляли с использованием программного обеспечения BLASTN. Зеленую массу люцерны (*Medicago sativa* (alfalfa)) измельчали и инокулировали бульонной культурой МКБ в концентрации 5×10^4 КОЕ/г и тщательно перемешивали. Затем 350 г указанной массы упаковывали в вакуумные пакеты и помещали в темную комнату на 62 дня при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$. По истечении указанного времени пакеты вскрывали, отбирали образцы для молекулярного анализа концентрации ДНК грибов и МКБ. ДНК из силоса выделяли путем измельчения 1 г силоса в ступке с жидким азотом. 100 мг суспензии помещали в пробирку с 500 мкл буфера СТАВ. Затем пробирки инкубировали при 55°C в течение 30 мин и добавляли 500 мкл хлороформа. Пробирки осторожно перемешивали и центрифугировали при $14\,500 \text{ мин}^{-1}$ в течение 5 мин. К супернатанту добавляли 500 мкл фенола для очистки ДНК от остатков белка. Пробирки осторожно встряхивали в течение 1 мин, а затем добавляли 500 мкл хлороформа и центрифугировали при $14\,500 \text{ мин}^{-1}$ в течение 3 мин. Супернатант переносили. Этот процесс повторяли, чтобы избавиться от фенола.

Затем ДНК осаждали изопропанолом. Осажденную ДНК дважды промывали в 500 мкл 70%-го этанола, а затем 95%-м этанолом. Осадок ДНК инкубировали при 55°C , затем растворяли в воде, свободной от нуклеаз, и хранили в морозильной камере. Реакционная смесь состояла из 5 мкл qPCRmix-HS SYBR, 5 нг матричной ДНК и 10 мкМ праймеров АСТ 512-F (5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC -3') и АСТ 783-R (5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT -3') для количественной оценки ДНК грибов, в то время как ITS-Lac F (5'-CCT TAG AAA GGA GGT GAT CCA GCC G -3') и ITS-Lac R (5'-CCG CCC GTC ACA CCA TGA GAG -3') использовали для количественной оценки ДНК МКБ.

ПЦР-РВ выполнялась с использованием термоциклера CFX96™ real-time PCR (BioRad, USA) по следующему протоколу: начальная стадия денатурации и активация полимеразы при 95°C в течение 5 мин с последующими 40 циклами, включая 15 с денатурации при 95°C , 20 с отжига при 60°C и 15 с элонгации при 72°C . Кривую плавления задавали в температурном интервале от 65 до 95°C ступенчато с шагом $0,5^\circ\text{C}$ и 5 с измерениями в каждом цикле для оценки участков амплификации. Данные результатов ПЦР-РВ были экспортированы в Microsoft Excel. Гистограммы были построены на основе средних значений с полосами ошибок, представляющими $\pm 2SD$ (стандартное отклонение).

Результаты исследований. Инкубация серийных разведений на среде Rogosa через 2 дня показала наличие колоний разного размера и концентрации. Планшет с серийным разведением до 10^{-6} использовали для отбора МКБ для идентификации 16S рРНК путем секвенирования (рис. 1). Данные штаммов в NCBI GenBank: MW350033 и MW350035.

После 62 дней силосования зеленой массы люцерны с изолятами *L1a* и *S1a R* методом ПЦР-РВ установлена эффективность этих штаммов МКБ в отношении уменьшения численности грибов в готовом силосе (рис. 2). Образцы силоса, инокулированные штаммом *S1a R*, содержали меньшую (на 25 %) концентрацию ДНК грибов

(0,00033 нг/нг), чем с *L1a* (0,00044 нг/нг). Наибольшая концентрация грибов была обнаружена в контрольных образцах без инокуляции МКБ и составила 0,007 нг/нг. Инокуляция зеленой массы люцерны выделенными штаммами *L1a* и *S1a R* снижает содержание ДНК грибов в образцах корма на 93,7 и 95,3 % соответственно.

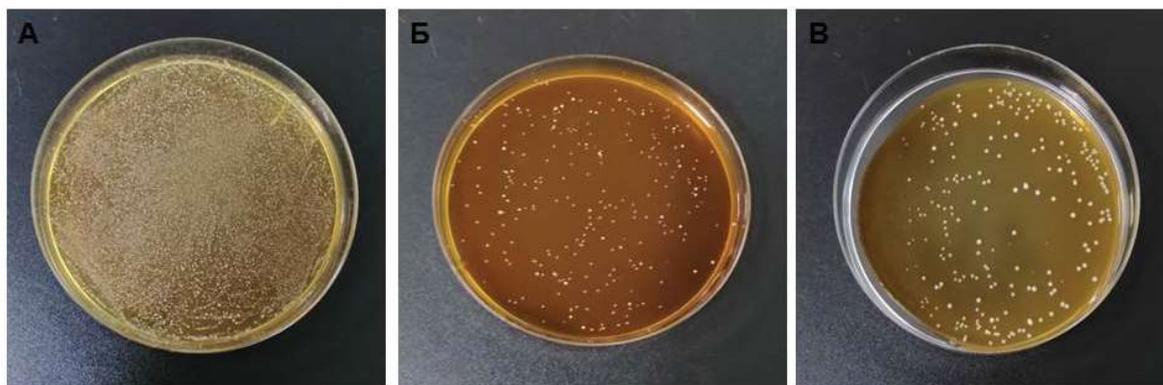


Рис. 1. Серийные разведения МКБ на агаре Rogosa (А – до 10^{-2} ; Б – до 10^{-4} ; В – до 10^{-6})

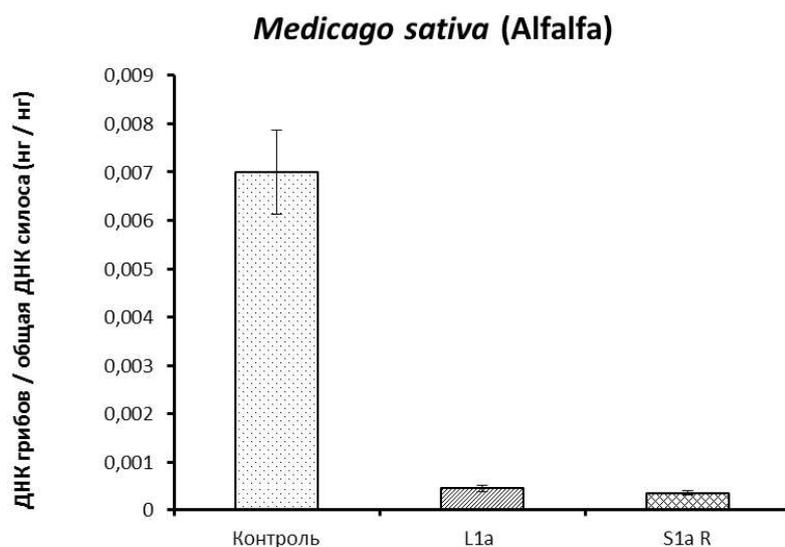


Рис. 2. Содержание ДНК грибов в силосе люцерновом

Концентрация ДНК МКБ в готовом силосе после инокуляции штаммами *L1a* и *S1a R* существенно отличалась от концентрации ДНК в готовых контрольных образцах корма (рис. 3). Образцы силоса, инокулированные штаммом *L1a*, имели наибольшее количество ДНК МКБ (0,00468 нг/нг); образцы силоса, инокулированные штаммом *S1a R*, содержали 0,00245 нг/нг ДНК МКБ. В контрольных образцах содержание ДНК МКБ составило 0,00176 нг/нг, что на 62,4 и 28,6 % ниже, чем при инокуляции *L1a* и *S1a R* соответственно.

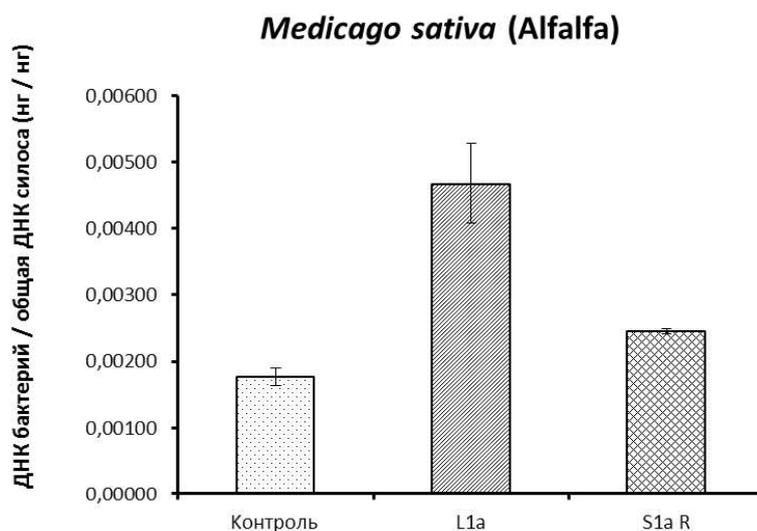


Рис. 3. Содержание ДНК бактерий в силосе люцерновом



Заклучение. Исследования показали, что новые штаммы *Lactocaseibacillus paracasei* L1a и *Lactiplantibacillus plantarum* S1a R, выделенные из фекалий крупного рогатого скота, обладают консервирующим эффектом зеленой массы люцерны. Они способны сокращать популяцию грибов и могут быть использованы при производстве биоконсервантов.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Мобилизация генетических ресурсов растений и животных, создание новаций, обеспечивающих производство биологически ценных продуктов питания с максимальной безопасностью для здоровья человека и окружающей среды». Номер регистрации: АААА-А18-118031390148-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams J. M. A review of the literature concerning losses in stored cereals and pulses, published since 1964 // Tropical Science. 1977. Vol. 19. P. 1–28.
2. Fungi and mycotoxins in silage: an overview / V. A. Alonso [et al.] // Journal of Applied Microbiology. 2013. Vol. 115 (3). P. 637–643.
3. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management / M. M. Zaki [et al.] // Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences. 2012. Vol. 4 (1). P. 13–28.
4. Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives / X. S. Guo [et al.] // Animal feed science and technology. 2008. Vol. 142 (1–2). P. 89–98.
5. Influence of the use of a biological preparation on the fermentation and quality of alfalfa haylage / I. T. Bikchantaev [et al.] // Bioscience Biotechnology Research Communications. 2020. Vol. 13 (10). P. 125–128.
6. Disease structure of milk cows and the effect of the mass fractions ratio of fat and protein in milk on the level of the metabolites / E. Krupin [et al.] // BIO Web of Conferences. 2020. Vol. 27. Art. Num. 40. P. 1–4.
7. Holzapfel W. H., Wood B. J. B. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In The genera of lactic acid bacteria Springer. Boston, MA. 1995. P. 1–6.
8. Different immune regulatory potential of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* isolated from kimchi / Y. F. Hong [et al.] // Journal of microbiology and biotechnology. 2014. Vol. 24 (12). P. 1629–1635.
9. Liu C. F., Pan T. M. In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity // Journal of Food and Drug Analysis. 2010. Vol. 18 (2). P. 77–86.
10. Effects of NS *Lactobacillus* strains on lipid metabolism of rats fed a high-cholesterol diet / X. Hu [et al.] // Lipids in Health and Disease. 2013. Vol. 12 (1). P. 1–12.
11. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review / E. Ringø [et al.] // Aquaculture Research. 2010. Vol. 41 (4). P. 451–467.
12. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation / S. Gutiérrez [et al.] // Journal of dairy science. 2016. Vol. 99 (4). P. 2654–2665.

REFERENCES

1. Adams J. M. A review of the literature concerning losses in stored cereals and pulses, published since 1964. Tropical Science. 1977;(19):1–28.
2. Fungi and mycotoxins in silage: an overview / V. A. Alonso [et al.]. Journal of Applied Microbiology. 2013;115(3):637–643.
3. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management / M. M. Zaki [et al.]. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences. 2012;4 (1):13–28.
4. Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives / X. S. Guo [et al.]. Animal feed science and technology. 2008;142(1–2):89–98.
5. Influence of the use of a biological preparation on the fermentation and quality of alfalfa haylage / I. T. Bikchantaev [et al.]. Bioscience Biotechnology Research Communications. 2020;13 (10):125–128.
6. Disease structure of milk cows and the effect of the mass fractions ratio of fat and protein in milk on the level of the metabolites / E. Krupin [et al.]. BIO Web of Conferences. 2020;27(40):1–4.
7. Holzapfel W. H., Wood B. J. B. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In The genera of lactic acid bacteria Springer. Boston, MA; 1995. P. 1–6.
8. Different immune regulatory potential of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* isolated from kimchi / Y. F. Hong [et al.]. Journal of microbiology and biotechnology. 2014;2(12):1629–1635.
9. Liu C. F., Pan T. M. In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. Journal of Food and Drug Analysis. 2010; 18(2):77–86.
10. Effects of NS *Lactobacillus* strains on lipid metabolism of rats fed a high-cholesterol diet. / X. Hu [et al.]. Lipids in Health and Disease. 2013;12(1):1–12.
11. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review / E. Ringø [et al.]. Aquaculture Research. 2010;41(4):451–467.
12. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation / S. Gutiérrez [et al.]. Journal of dairy science. 2016;99(4):2654–2665.

Статья поступила в редакцию 11.06.2021; одобрена после рецензирования 23.06.2021; принята к публикации 30.06.2021.
The article was submitted 11.06.2021; approved after reviewing 23.06.2021; accepted for publication 30.06.2021.

