

**ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ
НА БИОРАЗНООБРАЗИЕ РУБЦОВОЙ МИКРОФЛОРЫ ДОЙНЫХ КОРОВ****Крупин Е.О., Тагиров М.Ш.**

Реферат. Приведены результаты сравнительного анализа микробиоты рубца четырех групп дойных коров холмогорской породы татарстанского типа, принадлежащих ООО «Агрофирма Рассвет» Кукморского района Республики Татарстан. Первая группа животных являлась контрольной, а вторая, третья и четвертая – опытными. Животные контрольной группы получали основной хозяйственный рацион кормления. Животные опытных групп – экспериментальную кормовую добавку в количестве 100, 150 и 200 г на одну голову в сутки соответственно, в утреннее кормление. Экспериментальная кормовая добавка в своем составе содержит взятые в определенном соотношении ферменты, пробиотические микроорганизмы, L-карнитин и сапропель. Состав экспериментальной кормовой добавки разработан, а ее необходимое количество произведено в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Анализ микробиоты рубца осуществляли методом секвенирования по гену 16S рРНК на платформе IlluminaMiSeq в Казанском (Приволжском) федеральном университете. Полученные метагеномные данные анализировали с помощью QIIME pipeline с использованием базы данных Greengenes v.13.8 и RDP Classifier. Исследованиями установлено, что применение в составе рационов кормления коров экспериментальной кормовой добавки не оказывало видимого влияния на состав микробиоты рубца в целом, но повлияло на содержание важных функциональных групп микроорганизмов родов *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Anaeroplasmata* и *Ruminobacter*, обеспечивающих углеводный обмен, его интенсивность. Разница в индексе Шеннона дает основания полагать о наличии возможной зависимости продуктивного действия испытываемой кормовой добавки от равномерности распределения бактерий в рубце самих животных. Статья подготовлена в рамках государственного задания АААА-А18-118031390148-1.

Ключевые слова: корова, корм, пищеварение, микробиота, секвенирование, ДНК, метагеном.

Введение. Повышение молочной продуктивности животных тесно связано с нормальным течением физиологических процессов в их организме, важнейшая роль среди которых принадлежит процессам пищеварения [1].

В связи с анатомо-морфологическим строением пищеварительного аппарата жвачных животных, обуславливающим своеобразие физиологических функций организма, наличие богатой микробиоты и микрофауны в преджелудках, способствующей разложению большого количества растительного корма, они имеют характерные, присущие только им особенности процессов пищеварения [2, 3].

Рубец имеет большое значение в пищеварении жвачных. Исследования показали, что в нем переваривается до 70% сухого вещества рациона, причем это происходит без участия пищеварительных ферментов. Расщепление клетчатки и других питательных веществ корма осуществляется ферментами микроорганизмов, содержащихся в преджелудке. В нем протекают сложные микробиологические и биохимические процессы. Они и определяют молочную продуктивность животных, качество и технологические свойства получаемого от них молока-сырья во многом влияют на гомеостаз организма в целом, биохимические показатели крови, в частности и др. [4, 5, 6, 7]

Многие бактерии рубца являются строгими анаэробами и работа с ними не возможна в

обычных лабораториях, даже с целью фундаментальных исследований. Кроме того, как недавно было показано зарубежными специалистами, значительная часть микроорганизмов рубца представлена некультивируемыми видами (нежизнеспособными при культивировании на искусственных питательных средах), однако активными в процессах рубцовой ферментации. Для их идентификации следует применять современные методы, с применением которых, во многом, и получен материал, анализ которого представлен в статье [8, 9, 10, 11].

В последнее годы наблюдается значительное развитие подходов к секвенированию, направленных на изучение микробного сообщества. Эти подходы играют важную роль в мониторинге и сравнении большого количества образцов. Применение методов секвенирования нового поколения в анализе микробиологических сообществ расширяет наши знания и понимание сложности и разнообразия целого ряда экосистем [12, 13].

Условия, материалы и методы исследований. Исследования выполнены в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, Казанском (Приволжском) федеральном университете, ООО «Агрофирма Рассвет» Кукморского района Республики Татарстан на дойных коровах холмогорской породы татарстанского типа. Исследование продолжалось с 27 по 90 день

лактации до завершения периода раздоя. Животных разделили на четыре группы по 20 голов в каждой. Коровы содержались на привязи. Дойные коровы первой (контрольной) группы получали основной хозяйственный рацион (ОР). Животные второй, третьей, четвертой (опытных) групп дополнительно к ОР получали экспериментальный кормовой концентрат. Данный концентрат состоял из комплекса ферментов, пробиотических микроорганизмов, L-карнитина, сапропеля, взятых в определенном соотношении, в количестве 100, 150 и 200 г на одну голову в сутки соответственно, который скармливали отдельно, как самостоятельный компонент рациона в утреннее кормление. Состав экспериментального кормового концентрата разработан, а его необходимое количество произведено в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН.

Содержимое рубца у животных брали по общепринятой в ветеринарии методике [14] после завершения периода скармливания экспериментального кормового концентрата (на 91 день лактации). Из полученного рубцового содержимого выделили ДНК содержащейся в ней микробиоты модифицированным фенольным методом, подготовили библиотеки и секвенировали по гену 16S рРНК на платформе IlluminaMiSeq. Полученные метагеномные данные анализировали с помощью QIIME pipeline с использованием базы данных Greengenes v.13.8 и RDP Classifier. Указанные исследования проведены в Казанском (Приволжском) федеральном университете (А.М. Харченко, студент магистрант; Т.В. Григорьева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник).

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.

Анализ и обсуждение результатов. Определение содержания в рубцовой жидкости животных доли в микробном сообществе микроорганизмов рода *Ruminococcus* показало ее увеличение у животных третьей и четвертой групп (доля в микробном сообществе 0,039 и 0,033% соответственно, что выше, чем у животных контрольной группы на 116,7 и 83,3% соответственно) при дополнительном введении микроорганизмов данного рода с экспериментальным кормовым концентратом (рисунок 1). У животных третьей группы был установлен более высокий индекс Шеннона (8,80, что на 7,2 и 7,6% выше, чем у животных первой и четвертой групп соответственно, и

на 17,3% выше, чем у животных второй группы), характеризующий большее биоразнообразие рубцовой микробиоты и ее более равномерное распределение, в тоже время, на наш взгляд, наиболее равномерная представленность рубцовой микрофлоры помогла в большей степени кормовому концентрату повлиять на указанные выше изменения.

Обозначенная проблема, связанная с перевариванием и усваиванием различных кормовых средств, содержащих в своем составе определенные штаммы микроорганизмов, чаще всего обусловлена индивидуальными различиями у животных в микрофлоре рубца [15].

Оценка количества видов микроорганизмов рода *Ruminococcus* в микробном сообществе рубцовой жидкости показала значительное их разнообразие у животных третьей и четвертой группы (рисунок 2). Так, у животных указанных групп количество видов исследуемого рода микроорганизмов превосходило таковое у животных первой группы на 12,5 и 7,0% соответственно. В сравнении с животными второй группы установленное увеличение составило 29,1 и 22,8% соответственно.

Анализ всей микробиоты рубцовой жидкости в целом показал, что у животных первой,



Рисунок 1 – Величина индекса Шеннона и доля видов рода *Ruminococcus* в микробном сообществе рубцовой жидкости

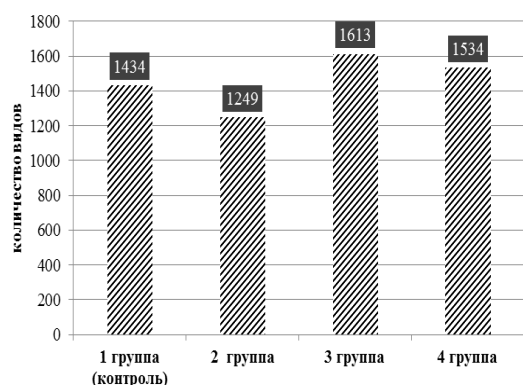


Рисунок 2 – Количество видов рода *Ruminococcus* в микробном сообществе рубцовой жидкости

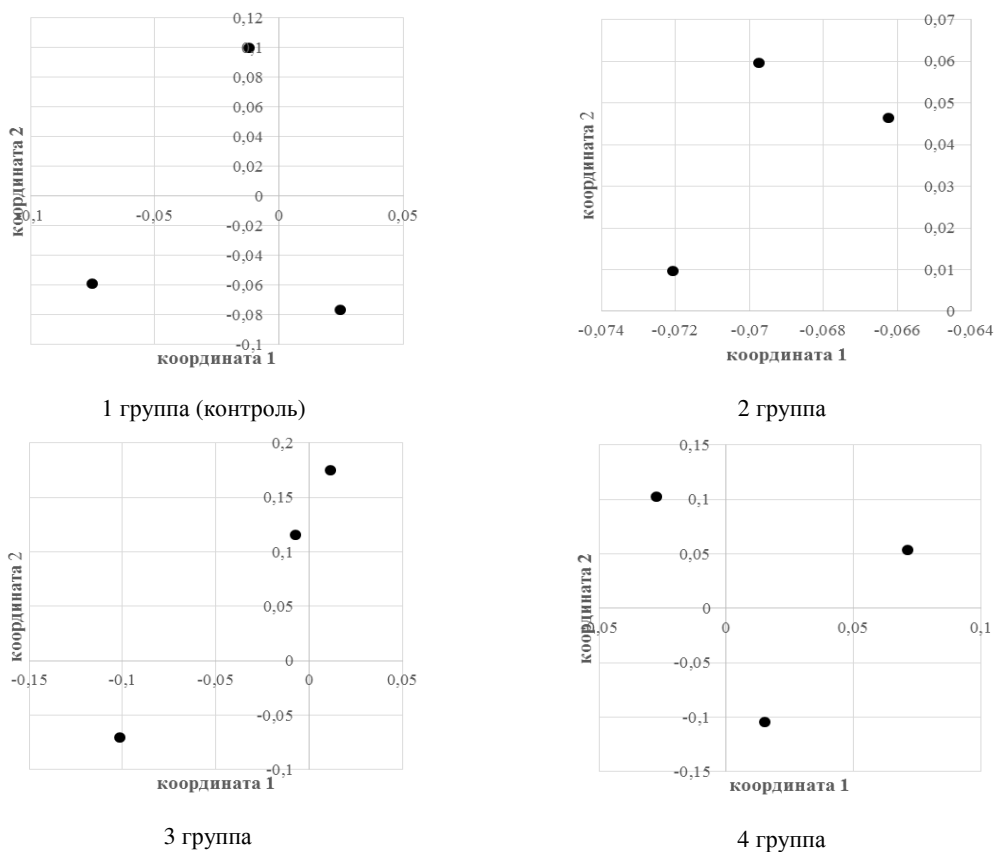


Рисунок 3 – Кластеризация на основе родового разнообразия микробиоты рубца дойных коров методом многомерного шкалирования

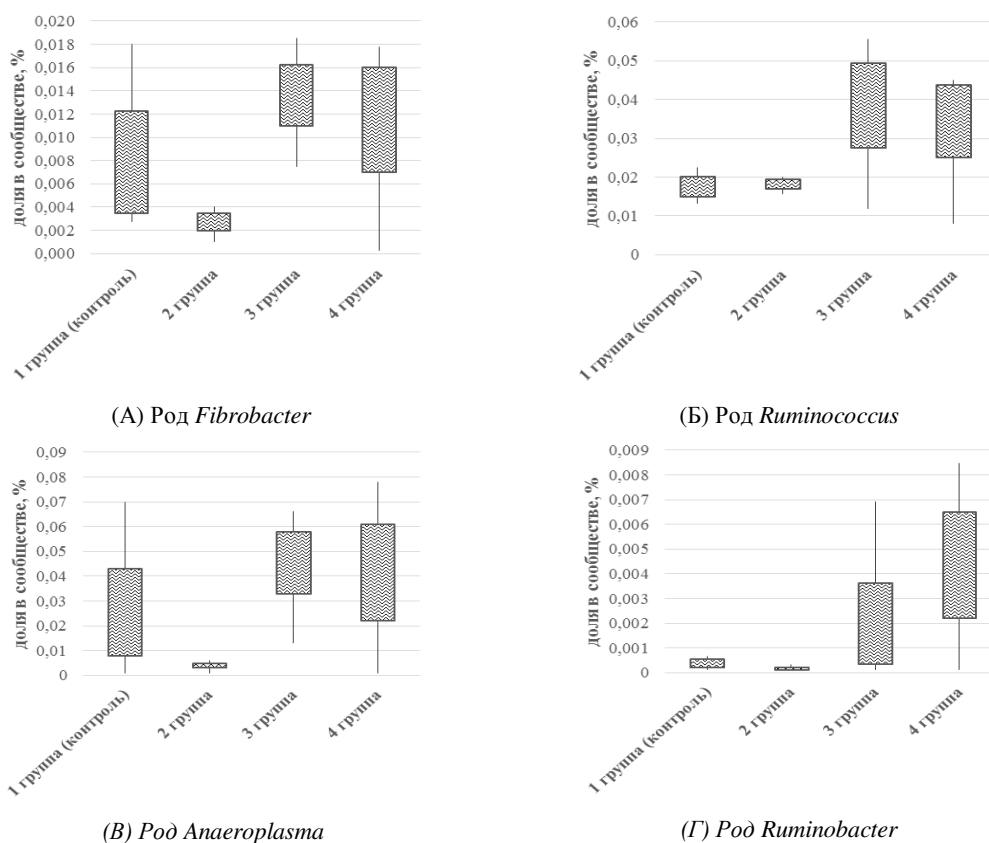


Рисунок 4 – Доля родов, утилизирующих углеводы растений, в микробном сообществе рубцовой жидкости

третьей и четвертой групп отсутствуют какие-либо зависимости от нормы ввода испытуемого кормового концентрата, однако, животные второй группы в этом отношении являются исключением (рисунок 3), о чем свидетельствует установленное распределение по координатам.

Считаем целесообразным полученные данные обогатить новыми сведениями после проведения более масштабных исследований на большем поголовье животных различных популяций для установления достоверности полученных изменений. Кроме того, отметим, что рубце животных и его содержанием присутствует большое количество различных видов микроорганизмов, из которых не все поддаются влиянию экспериментального кормового концентрата, как фактора.

Если же рассматривать влияние экспериментального кормового концентрата в целом на важные функциональные группы микроорганизмов в рубце, то можно заметить, что увеличение нормы его скармливания положительно влияет на группы бактерий, участвующих в углеводном обмене жвачных животных (рисунок 4). Так у животных всех групп при испытуемых дозах скармливания экспериментального кормового установлено повышение

доли в сообществе родов *Fibrobacter* (А), *Ruminococcus* (Б), *Anaeroplasma* (В) и *Ruminobacter* (Г). Действительно, микроорганизмы рода *Fibrobacter* и *Ruminococcus* являются целлюлолитическими бактериями, бактерии рода *Anaeroplasma* также обладают способностью ферментировать широкий спектр растительных углеводов, а бактерии рода *Ruminobacter* эффективно сбраживают мальтозу и крахмал [16, 17, 18].

Выводы. Применение коровам в составе рационов кормления испытуемого кормового концентрата не оказывало видимого влияния на весь состав микрофлоры рубца, но повлияло на содержание важных функциональных групп микроорганизмов, обеспечивающих углеводный обмен у коров. Разница в индексе Шеннона показала возможную зависимость переваривания и усваивания экспериментального кормового концентрата с находящимися в его составе микроорганизмами рода *Ruminococcus* от равномерности распределения бактерий в рубце животных. Для достоверного подтверждения установленных тенденций считаем целесообразным проведение данных исследований на большем поголовье животных различных популяций.

Литература

1. Белехов Г.П., Чубинская А.А. Минеральное и витаминное питание сельскохозяйственных животных. – Л.: Колос, 1965. – 86 с.
2. Киселев С., Петухов М. Полноценное кормление коров / Животноводство России. – 2005. – № 6. – С. 47-48.
3. Курилов Н. В. Кроткова А.П. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М.: Колос, 1971. – 431 с.
4. Григорьев В.С., Бакаева Л.Н. Ростовые и биологические особенности телят при разных методах кормления / Известия Самарской ГСХА. – 2012. – №1. – С. 103-107.
5. Эффективность использования симментальского и лимузинского скота для производства говядины при чистопородном разведении и скрещивании: монография / В. И. Косилов, А. И. Кувшинов, Э. Ф. Муфазалов [и др.]. – Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2005. – 246 с.
6. Огуй В.Г., Афанасьева А.И., Катаманов С.Г. Адаптивные методы кормления коров в сухостойный период. – Барнаул : АГАУ, 2007. – 155 с.
7. Влияние экспериментальной кормовой добавки на активность ферментов сыворотки крови и показатели рубцовой жидкости коров / Е.О Крупин, Ш.К. Шакиров, Т.В. Жарехина, М.Ш. Тагиров // Вестник Казанского ГАУ. – 2018. – №2 (49). – С. 39-42.
8. Погосян, Д.Г., Чудайкин В.В. Распадаемость протеина в рубце бычков при физических способах обработки кормов / Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 6 (80). – С. 64-67.
9. Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. – М.: Научный мир, 2006. – 188 с.
10. Hungate R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J. R., Ribbons D. W. (eds). *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press, London and New York, p. 117–132, 1969.
11. Web based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities / A.D. Kent, D.J. Smith, B.J. Benson, E.W. Triplett // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 6768-6776.
12. Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs / M. A. Fischer, S. Güllert, S. C. Neulinger, W. R. Streit, R. A. Schmitz // *Frontiers in Microbiology.* 2016. V.7. 1297 p.
13. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta, rumen liquid and solid fractions in lactating Holstein cows / Sh. Ji, H. Zhang, H. Yan, A. Azarfar, H. Shi, G. Alugongo, Sh. Li, Zh. Cao, Y. Wang // *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 2017. V.8. 16p.
14. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / Кондрахин И.П., Ар-

- хипов А.В., Левченко В.И., Таланов Г.А., Фролова Л.А., Новиков В.Э. – М.: Колос. 2004. – 520 с.
15. Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity / *Microbes and Environments*. 2015. V.30, N2. P. 126-132.
16. Béra-Maillet C., Ribot Y., Forano E. Fiber-Degrading Systems of Different Strains of the Genus *Fibrobacter* / *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. V.70. P. 2172-2179.
17. Effects of Nitrate Addition on Rumen Fermentation, Bacterial Biodiversity and Abundance / L. Zhao, Q. Meng, L. Ren, W. Liu, X. Zhang, Y. Huo, Z. Zhou // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2015. V.28. P. 1433-1441.
18. Пристеночная микрофлора кишечника / И. Д. Лоранская, М. Н. Болдырева, О. А. Лаврентьева, Э. В. Мулухова. – Москва: Прима Принт, 2015. – 100 с.

Сведения об авторах

Крупин Евгений Олегович – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, evgeny.krupin@gmail.com

Тагиров Марсель Шарипзянович – доктор сельскохозяйственных наук, академик АН РТ, tatniva@mail.ru
Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г.Казань, Россия.

INFLUENCE OF THE EXPERIMENTAL FOOD ADDITIVE ON BIODIVERSITY OF THE CICATRICIAL MICROFLORA OF DAILY COWS

Krupin E.O., Tagirov M.Sh.

Abstract. The results of a comparative analysis of the microbiota of the rumen of four groups of dairy cows of the Kholmogory breed of the Tatarstan type, belonging to LLC “Agrofirma Rassvet” of Kukmorsky district of the Republic of Tatarstan, are given. The first group of animals was control, and the second, third and fourth - experienced. The animals of the control group received the basic economic diet of feeding. The animals of the experimental groups are experimental feed supplement in the amount of 100, 150 and 200 g per head per day, respectively, in the morning feeding. The experimental feed additive in its composition contains enzymes, probiotic microorganisms, L-carnitine and spropel taken in a certain ratio. The composition of the experimental fodder additive is developed, and its required quantity is produced in Tatar Scientific Research Institute of Agriculture. Analysis of the rumen microflora was performed by sequencing the 16S рPHK gene on the IlluminaMiSeq platform at the Kazan (Volga) Federal University. The resulting metagenomic data was analyzed using a QIIME pipeline using the Greengenes v.13.8 database and the RDP Classifier. Studies have established that the use of cows in the diets of feeding an experimental feed additive did not have a visible effect on the composition of the rumen microflora as a whole, but it affected the content of important functional groups of the microorganisms of the genera *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Anaeroplasm*a and *Ruminobacter*, which ensure carbohydrate metabolism and its intensity. The difference in the Shannon index gives grounds to believe that there is a possible dependence of the productive effect of the test feed additive on the uniformity of the distribution of bacteria in the rumen of the animals themselves. The article was prepared within the framework of state task AAAA-A18-118031390148-1.

Key words: cow, feed, digestion, microbiota, sequencing, DNA, metagen

References

1. Belekhov G.P., Chubinskaya A.A. *Mineralnoe i vitaminoe pitanie selskokhozyaystvennykh zhivotnykh*. [Mineral and vitamin nutrition of farm animals]. L.: Kolos, 1965. P. 86.
2. Kiselev S., Petukhov M. *High-grade feeding of cows*. [Polnotsennoe kormlenie korov]. / *Zhivotnovodstvo Rossii*. - Livestock of Russia. 2005. №6. P. 47-48.
3. Kurilov N. V., Krotkova A.P. *Fiziologiya i biokhimiya pishevareniya zhvachnykh*. [Digestion physiology and biochemistry of ruminants]. M.: Kolos, 1971. P. 431.
4. Grigorev V.S., Bakaeva L.N. Growth and biological features of calves with different feeding methods. [Rostovye i biologicheskie osobennosti telyat pri raznykh metodakh kormleniya]. / *Izvestiya Samarskoy GSKhA*. – *News of Samara SAU*. 2012. №1. P. 103-107.
5. *Effektivnost ispolzovaniya simmentalskogo i limuzinskogo skota dlya proizvodstva govyadiny pri chistopородном razvedenii i skreshchivanii: monografiya*. [Efficiency of the use of Simmental and Limousine livestock for the production of beef with thoroughbred breeding and crossing: monograph]. / V. I. Kosilov, A. I. Kuvshinov, E. F. Mufazalov and others. Orenburg: Izdatelskiy tsentr OGAU, 2005. P. 246.
6. Oguy V.G., Afanaseva A.I., Katamanov S.G. *Adaptivnye metody kormleniya korov v sukhostoinnyy period*. [Adaptive methods of feeding cows in the dry period]. Barnaul : AGAU, 2007. P. 155.
7. Influence of the experimental feed additive on the activity of serum enzymes and indices of cows scar tissue. [Vliyanie eksperimentalnoy kormovoy dobavki na aktivnost fermentov syvorotki krovi i pokazateli rubtsovoy zhidkosti korov]. / E.O Krupin, Sh.K. Shakirov, T.V. Zharekhina, M.Sh. Tagirov // *Vestnik Kazanskogo GAU*. – *The Herald of Kazan SAU*. 2018. №2 (49). P. 39-42.
8. Pogosyan D.G., Chudaykin V.V. Disintegration of protein in the rumen of gobies with physical methods of processing feeds. [Raspadaemost proteina v rubtse bychkov pri fizicheskikh sposobakh obrabotki kormov]. / *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. – *The Herald of Altai State Agrarian University*. 2011. № 6 (80). P. 64-67.
9. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishevaritelnogo trakta selskokhozyaystvennykh zhivotnykh i ptitsy*. [Methods for studying the microflora of the digestive tract of agricultural animals and poultry]. M.: Nauchnyy mir, 2006. P. 188.
10. Hungate R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J. R., Ribbons D. W. (eds). *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press, London and New York, p. 117—132, 1969.

11. Web based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities / A.D. Kent, D.J. Smith, B.J. Benson, E.W. Triplett // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 6768-6776.
12. Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs / M. A. Fischer, S. Güllert, S. C. Neulinger, W. R. Streit, R. A. Schmitz // *Frontiers in Microbiology.* 2016. V.7. 1297 p.
13. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta, rumen liquid and solid fractions in lactating Holstein cows / Sh. Ji, H. Zhang, H. Yan, A. Azarfar, H. Shi, G. Alugongo, Sh. Li, Zh. Cao, Y. Wang // *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 2017. V.8. 16p.
14. *Metody veterinarnoy klinicheskoy laboratornoy diagnostiki: Spravochnik.* [Methods of veterinary clinical laboratory diagnosis: Handbook]. / Kondrakhin I.P., Arkhipov A.V., Levchenko V.I., Talanov G.A., Frolova L.A., Novikov V.E. M.: Kolos. 2004. P. 520.
15. Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity / *Microbes and Environments.* 2015. V.30, N2. P. 126-132.
16. Béra-Maillet C., Ribot Y., Forano E. Fiber-Degrading Systems of Different Strains of the Genus *Fibrobacter* / *Applied and Environmental Microbiology.* 2004. V.70. P. 2172-2179.
17. Effects of Nitrate Addition on Rumen Fermentation, Bacterial Biodiversity and Abundance / L. Zhao, Q. Meng, L. Ren, W. Liu, X. Zhang, Y. Huo, Z. Zhou // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 2015. V.28. P. 1433-1441.
18. *Pristenochhnaya mikroflora kishhechnika.* [Parietal microflora of the intestine]. / I. D. Loranskaya, M. N. Boldyreva, O. A. Lavrenteva, E. V. Mulukhova. Moskva: Prima Print, 2015. P.100.

Authors:

Krupin Evgeniy Olegovich – Ph.D. of Veterinary Science, leading research officer, “Federal Research Center” Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Tatar Scientific Research Institute of Agriculture - a separate structural unit of “Federal Research Center “Kazan Research Center of the Russian Academy of Sciences”. 48, Orenburgskiy tract, Kazan, 420059. Tel. (843) 277-81-17, evgeny.krupin@gmail.com

Tagirov Marsel Sharipzyanovich – Doctor of Agricultural Sciences, Academician of the Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan, “Federal Research Center “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, head of Tatar Scientific Research Institute of Agriculture - separate structural subdivision of “Federal Research Center “Kazan Research Center of the Russian Academy of Sciences”, 48, Orenburgskiy tract, Kazan, 420059, Tel. (843) 277-81-17, tatniva@mail.ru