

университет). – 2021. – № 4 (61). – С. 108–125.

5. Петруша Ю. К. Фитобиотики в кормлении сельскохозяйственной птицы (обзор) / Ю. К. Петруша, С. В. Лебедев, В. В. Гречкина // Животноводство и кормопроизводство. – 2022. – Т. 105. – № 1. – С. 103–118.

6. Тимофеев Н. П. Фитобиотики в мировой практике: виды растений и действующие вещества, эффективность и ограничения, перспективы (обзор) / Н. П. Тимофеев // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2021. – Т. 22. – № 6. – С. 804–825.

7. Ahmadzadeh-Gavahan L. Feed restriction and supplementing with propylene glycol, monensin sodium and rumen-protected choline chloride in periparturient Ghezel ewes: Implications on production and performance of ewes and their offspring / L. Ahmadzadeh-Gavahan and A. Hosseinkhani // Livestock Science. – 2021. – Vol. 255. – P. 104784.

8. Dhama K. Growth Promoters and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles and Beneficial Applications: the Trends and Advances: A Review / K. Dhama, R. Tiwari, K. Ru, S. M. G. Chakraborty, K. Karthik, M. Saminathan, P. A. Desingu, L. T. Sunkara // International journal of pharmacology. – 2014. – Vol. 10. – Issue 3. – Pp. 129–159.

9. Kothari D. Effect of Dietary Supplementation of Fermented Pine Needle Extract on Productive Performance, Egg Quality, and Serum Lipid Parameters in Laying Hens / D. Kothari, J.S. Oh, J.H. Kim, W.-D. Lee, S.-K. Kim // Animals. – 2021. – Vol. 11. – Pp. 1–11.

10. Ramay S. M. Effects of supplemental pine needles powder (*Pinus brutia*) on growth performance, breast meat composition, and antioxidant status in broilers fed linseed oil-based diets / S. M. Ramay, S. Yalçın // Poultry Science. – 2020. – No 99. – Pp. 479–486.

DOI: 10.48612/sbornik-2023-1-15

УДК 579.851

16S МЕТАБАРКОДИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Даугалиева Аида Тлековна¹, канд. вет. наук

Ашанин Алексей Ильич¹, д-р с.-х. наук, профессор

Даугалиева Сауле Тлековна², канд. вет. наук

Канатбаев Серик Ганиевич³, д-р биол. наук, профессор

¹ТОО «Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства», г. Алматы, Республика Казахстан

²ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,

г. Алматы, Республика Казахстан

³«Западно-Казахстанская научно-исследовательская станция» филиал ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», Уральск, Республика Казахстан

В статье приводятся сведения о влиянии рациона с добавлением семян льна, а также типов кормления на выработку метана крупным рогатым скотом. Выработка метана зависит от концентрации архей в микробиоме желудочно-кишечного тракта животных. В результате проведенных исследований установлено, что введение семян льна в рационы коров способствует уменьшению выработки метана. Пастбищное содержание бычков в отличие от стойлового также способствует уменьшению эмиссии метана.

Ключевые слова: микробиом; крупный рогатый скот; тип кормления; семена льна; селекционирование нового поколения.

16S METABARCODE ANALYSIS OF CATTLE MICROBIOTA

Daugaliyeva Aida Tlekovna¹, PhD Vet. Sci.

Ashanin Alexey Ilyich¹, Dr. Agr. Sci., Professor

Daugaliyeva Saule Tlekovna², PhD Vet. Sci.

Kanatbayev Serik Ganievich³, Dr. Biol. Sci., Professor

¹LLP "Kazakh Research Institute for Livestock and Fodder Production", Almaty, Republic of Kazakhstan

²LLP "Scientific Production Center of Microbiology and Virology", Almaty, Republic of Kazakhstan

³"West Kazakhstan Scientific Veterinary Station" branch of "Kazakh Scientific Research Veterinary Institute" Uralsk, Republic of Kazakhstan

The article provides information on the effect of flaxseed diets, as well as feeding types, on methane production in cattle. The production of methane depends on the concentration of archaea in the microbiome of the gastrointestinal tract of animals. As a result of the research, it was found that the introduction of flax seeds into the diets of cows helps to reduce the production of methane. The grazing keeping of steers, in contrast to the stall keeping, also contributes to a decrease in methane emissions.

Key words: microbiome; cattle; type of feeding; flax seeds; new generation sequencing

Свыше половины метана в атмосфере – результат развития сельского хозяйства, прежде всего животноводства. Метан образуется в качестве побочного эффекта при пищеварительных процессах крупного рогатого скота. Выбросы метана животными в окружающую среду способствуют изменению климата. Метан приводит к парниковому эффекту: по сравнению с углекислым газом он способен задерживать больше тепла, чем диоксид углерода. Желудочные газы в результате неправильного питания и пищеварения животных становятся проблемой стран с развитым сельским хозяйством. К 2030 году ожидается увеличение температуры окружающей среды от 1,5 до 2 °С.

Казахстан – страна с развитым животноводством, в которой с каждым годом увеличивается поголовье крупного рогатого скота (КРС), соответственно, выделяется больше метана. Для уменьшения выбросов метана необходимо менять рацион коров [1]. D. C. Uprey с соавт. отмечают, что соотношение концентратов и грубого корма в рационе влияет на показатели роста животного, брожение в рубце, выбросы метана и здоровье животных [2]. Как правило, когда доля грубого корма выше, размножаются целлюлозоразрушающие бактерии и в рубце преобладает уксуснокислое брожение с выработкой водорода, что стимулирует массивное размножение архей. Увеличение численности архей ведет к увеличению выброса метана.

Однако, когда увеличивается доля концентрата в рационе, показатели pH в рубце снижаются, что сдерживает рост архей и инфузорий, при этом увеличивается выработка пропионовой кислоты. Ряд авторов установили, что состав органического вещества (угле-

водов) в рационе животных влияет на характер и скорость ферментации, а также на образование незаменимых жирных кислот (НЖК) и метана [3]. Рационы с крахмалом стимулируют продукцию пропионата и снижают выработку метана. Такие рационы влияют на pH рубца и образование метана. Рационы с содержанием грубых кормов имеют обратное действие. Влияние состава рациона на эмиссию метана установили и другие учёные [4]. В Индии установлено, что голштинские коровы питаются качественными рационами и продуцируют в 6–7 раз меньше метана на 1 л молока, чем местные, что позволяет снизить эмиссию метана на 20–30 % за счёт поголовья [5]. Другим способом снижения метаногенеза в рубце может быть ингибирование за счёт образования альтернативных продуктов. Так, ацетогенные бактерии в толстом кишечнике млекопитающих продуцируют уксусную кислоту при редукации углекислого газа (CO₂) с участием водорода (H₂), образуемого в процессе ферментации углеводов в толстом кишечнике [9]. Обогащение рациона животных жирами ведёт к уменьшению инфузорий в рубце и снижению метана, причём источник жира влияет на эффективность его действия [6]. Показано ингибирование метаногенеза при добавлении жиров (например, семян льна) к рациону [7]. При добавлении к корму пробиотика из гриба *Aspergillus oryzae* уменьшается образование метана в рубце на 50 %, что связано со снижением количества инфузорий в рубцовом содержимом (на 45 %) [8]. Добавление *Saccharomyces cerevisiae in vitro* в инкубационную систему ведёт к сокращению метана на 10 %, в то время как добавление *in vivo* — не влияет на неё [9]. Разложение растительной клетчатки происходит в результа-

те гидролиза полисахаридов на мономеры. Мономеры ферментируются ацидогенезом, что приводит к образованию органических и короткоцепочечных жирных кислот. Также образуются H_2 и CO_2 . Метаногены удаляют H_2 путём восстановления CO_2 с образованием метана [10]. Поэтому понимание микробного состава желудочно-кишечного тракта жвачных животных важно для оценки степени выработки метана. Разработка диеты для крупного рогатого скота с целью снижения эмиссии метана и его негативного воздействия на окружающую среду является актуальной глобальной экологической проблемой.

Методика исследований. В проведенном исследовании сравнивали роды и семейства микроорганизмов кишечного содержимого коров, которых кормили семенами льна (ТОО «Журавлевское» Акмолинская область) и которых семенами льна не кормили (СПК «Ет-Арк Манкент», Туркестанская, ТОО «Алабота» Северо-Казахстанская и ТОО «Байсерке Агро» Алматинская области); а также бычков с пастбищным и сено-концентратным типом кормления (ОПХ «ТОО КазНИИЖиК» «Курозек», Жамбылского района, Алматинская область).

Исследование микробиома КРС было проведено с помощью 16S метагеномного анализа на секвенаторе Illumina MiSeq по технологии секвенирования нового поколения (NGS). Для анализа были ректально отобраны образцы фекалий от КРС, обитающих в различных регионах страны. Образцы доставлены в термочемодане с хладозементами и хранились при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для выделения ДНК было взято 200 мг образцов фекалий. ДНК выделяли набором для очистки ДНК микробиома PureLink™ (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Генетические библиотеки для метагеномного секвенирования 16S были подготовлены в соответствии с руководством (№ 15044223 rev. A). Библиотеки с PhiX секвенировали набором MiSeq® Reagent Kit v3 на 600 циклов (Illumina Inc., США).

Данные 16S метабаркодирования образцов проанализированы с помощью рабо-

чих процессов Data QC. Данные сгенерированы из прогона MiSeq и состояли из демультимплексированных файлов fastq, которые были импортированы в программное обеспечение CLC Genomics Workbench v. 22. (Qiagen). Перед началом кластеризации риды были обрезаны, а чтения с низким охватом были удалены из анализа. Последовательности 16S праймеров для секвенирования предоставлялись в формате clc. В качестве базы данных при анализе использовалась SILVA SSU v. 138. (www.arb-silva.de/documentation/release-138).

В модуле CLC Microbial Genomics для измерения альфа- и бета-разнообразия использовалось филогенетическое дерево всех операционных таксономических единиц (OTU) (филогенетическое разнообразие и расстояния UniFrac). Филогенетическое дерево реконструировалось с использованием подхода максимального правдоподобия, основанного на выравнивании последовательностей (MSA) OTU, сгенерированных в стенде MUSCLE. С целью оценки сходства между образцами проведён дифференциальный анализ численности с тем, чтобы найти OTU, которые имеют наиболее различающуюся численность в образцах. Достоверность результатов оценена анализом Permapova, который можно использовать для измерения величины эффекта и значимости бета-разнообразия.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований были получены гистограммы на уровне семейства и рода микроорганизмов (рисунки 1–4), которые показали различия, значимость которых была оценена после статистического анализа.

При сравнении животных, которых кормили с добавлением семян льна и без, было отмечено высокое содержание семейств *Bifidobacteriaceae*, *Methanobacteriaceae* и *Saccharimonadaceae* в группе, характеризующейся отсутствием семян льна. Эти семейства были представлены родами *Bifidobacterium*, *Methanobrevibacter* и *Candidatus saccharimonas* соответственно, которые показали различный уровень численности.

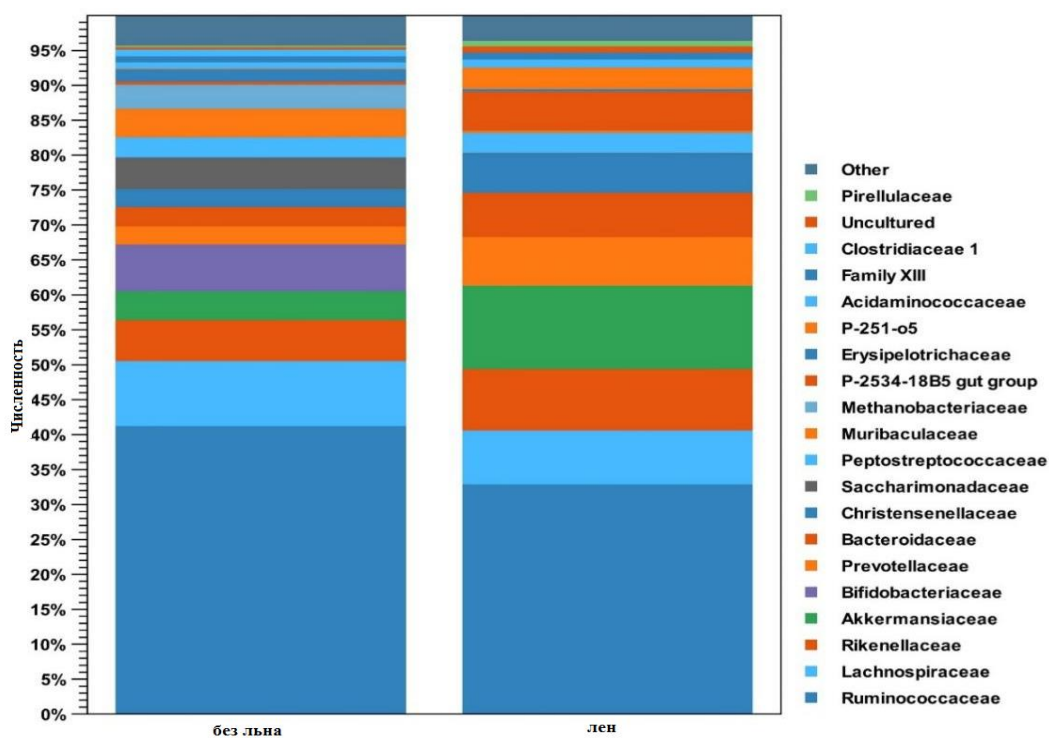


Рисунок 1 – Микробиота образцов фекалий на семейном уровне в сравнении с кормлением семенами льна

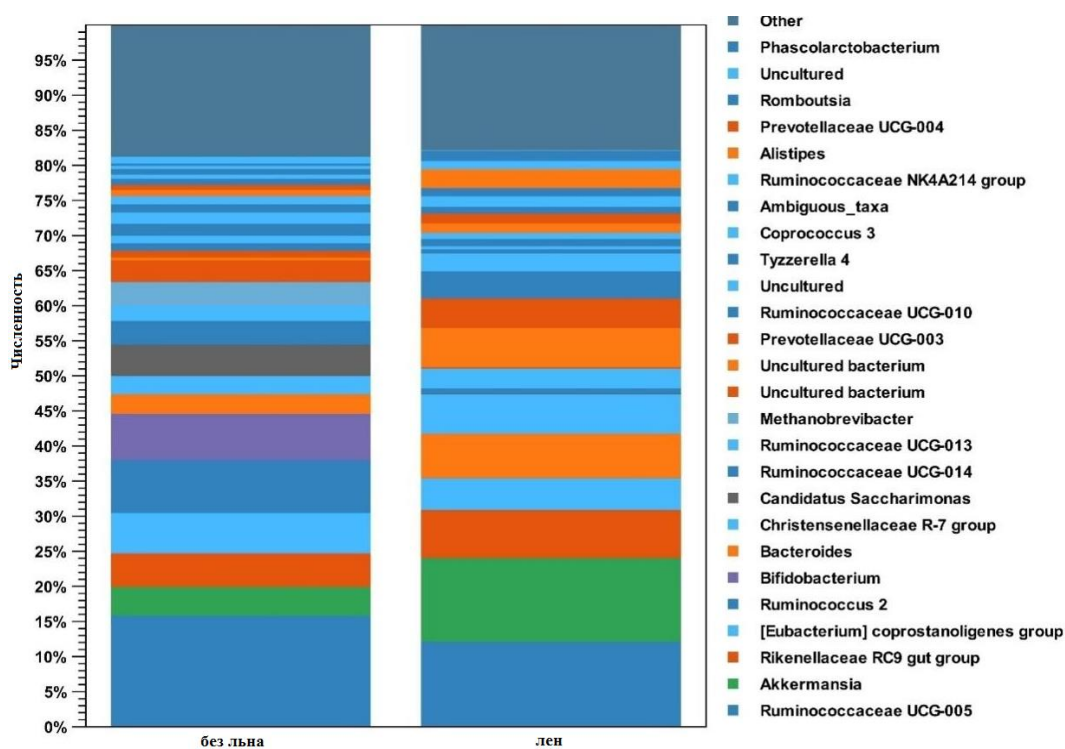


Рисунок 2 – Микробиоты образцов фекалий на уровне рода в сравнении с кормлением семенами льна

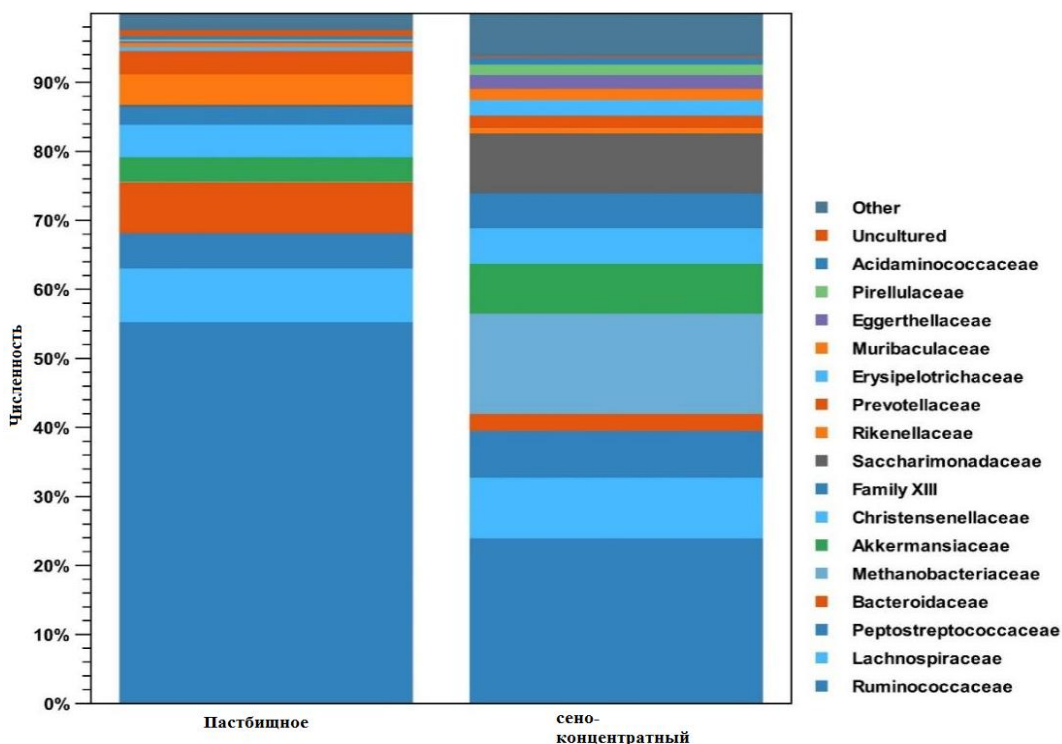


Рисунок 3 – Микробиоты образцов фекалий на семейном уровне при сравнении пастбищного и сено-концентратного типа кормления

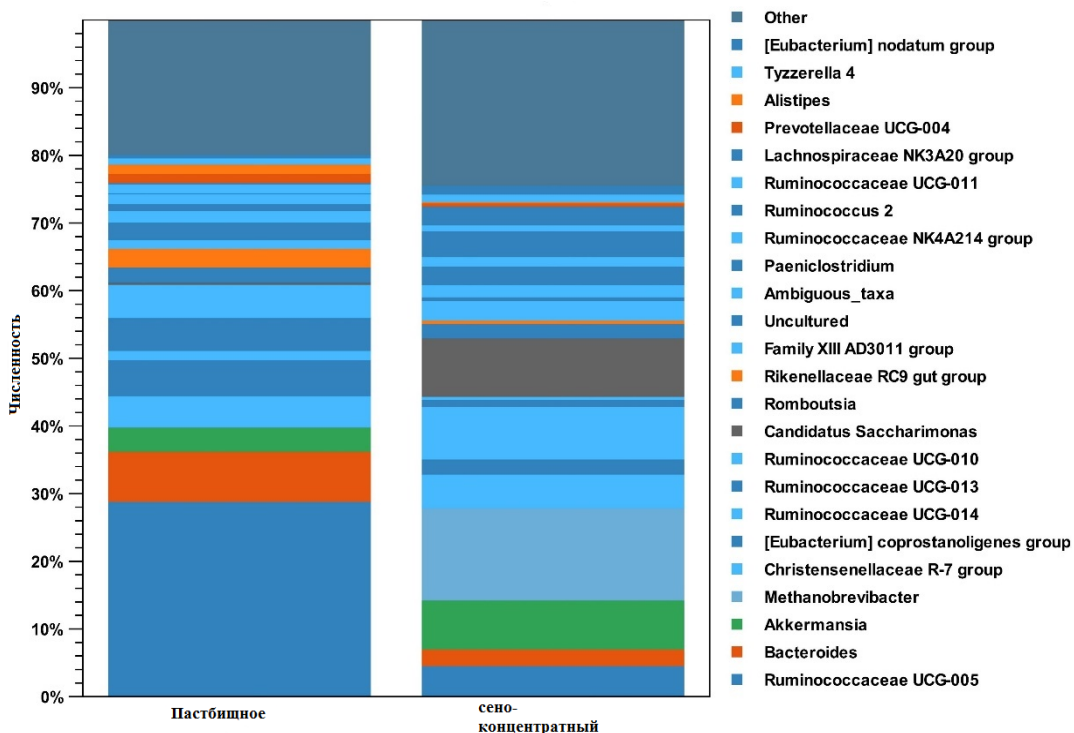


Рисунок 4 – Микробиоты образцов фекалий на уровне рода при сравнении пастбищного и сено-концентратного типа кормления

Проведенный анализ показал также высокое присутствие семейств *Methanobacteriaceae* (роды *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera*) и *Saccharimonadaceae* (род *Candidatus saccharimonas*) в микробиоте животных, которых кормили сено-концентратным типом, в то время как большее обилие семейств *Rikenellaceae* и *Bacteroidaceae* наблюдалось на пастбище.

Выводы. В результате проведенного исследования было выявлено, что животные, в корм которых не добавляли семена льна, выделяли большее количество метана в атмосферу, в связи с тем, что в кишечном содержимом были обнаружены метаногены (сем. *Methanobacteriaceae*, род *Methanobrevibacter*). Бычки, которые находились на стойловом содержании (сено-концентратный тип кормления), выделяли большее количество метана по сравнению с пастбищным содержанием животных.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP09259133).

Список литературы

1. Коровы как источник парникового эффекта? – 2016. URL: <https://ru.euronews.com/methanegas-threatening-to-slow-efforts-to-slow-climate-change>.
2. Uprety D. C. Технология для смягчения последствий изменения климата / D. C. Uprety, D. Subash, H. Dong, A. Bruce, A.G. Kimball, U. Jigeesha. – Нью-Дели, 2012. – 141 с.
3. Ross E. M. Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing / E.M. Ross, P.J. Moate, L. Marett, B.G Cocks. and B.J. Hayes // J. Dairy Sci. – 2013. – Vol. 96. – P.6030–6046. URL: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6766>.
4. Matthews C. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and

meat production and nitrogen utilisation efficiency / C. Matthews, F. Crispie, E. Lewis, M. Reid, P.W. O'Toole, P.D. Cotter // Gut Microbe. – 2019. – Vol. 10. – No. 2. – P.115–132. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176>.

5. Kelly W.J. Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria / W. J. Kelly, S. C. Leahy, J. Kamke, P. Soni, S. Koike, R. Mackie, R. Seshadri, G. M. Cook, S. E. Morales, C. Greening, G. T. Attwood // Animal Microbiome. – 2019. – P.1:15. URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s42523-019-0016-0>.

6. Wallace R. J. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions / R. J. Wallace, G. Sasson, E. Gregson, P. Bani, R. A. Bayat, F. Strozzi, and I. Mizrani // Science advances. – 2019. – Vol.5. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aav8391>.

7. Martinez-Fernandez G. Methane Inhibition Alters the Microbial Community, Hydrogen Flow, and Fermentation Response in the Rumen of Cattle / G. Martinez-Fernandez, S. E. Denman, C. Yang, J. Cheung, M. Mitsumori, C. S. McSweeney // Front Microbiol. – 2016. –Vol. 7. URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01122>.

8. Freetly H. C. Digestive tract microbiota of beef cattle that differed in feed efficiency / H. C. Freetly, A. Dickey, A. K. Lindholm-Perry, R. M. Thallman, J. W. Keele, A. P. Foote, and J. E. Wells // J. Anim. Sci. – 2020. – P.1–16. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/jas/skaa008>.

9. Freetly H. C. Methane production and methanogen levels in steers that differ in residual gain / H. C. Freetly, A. K. Lindholm-Perry, K. E. Hales, T. M. Brown-Brandl, M. Kim, P. R. Myer, J. E. Wells // J. Anim. Sci. – 2015. – Vol.93. – P.2375–2381. URL: <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2014-8721.17>.

10. Morgavi D. P. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants / D. P. Morgavi, E. Forano, C. Martin, C. J. Newbold // Animal. – 2010. – Vol. 6 (5). – P. 1024–1036. URL: <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110000546>.