

ков. – Петрозаводск, 1976. – 288 с.
24. Сладечек, В. Общая биологическая схема качества воды / В. Сладечек // Сб. “Санитарная и техническая гидробиология”. – Москва: Наука, 1970.
25. Стекольников, А.А. Особенности сезонного эколого-токсикологического состояния реки Волхов / А.А. Стекольников // Вопр. нормативно-правового регу-

лирования в ветеринарии. – 2014. – № 3. – С. 229–235.

26. Федорова, Г.В. Влияние токсических веществ на популяции сигов / Г.В. Федорова, Н.М. Аршаница // V Всесоюз. конф. по водной токсикологии (Одесса, 18-22 апреля 1988 г.) / Тез. докл. – Москва, 1988. – С. 36–37.

УДК 636.03+636.084/.087+ 579.8 +57.063.7

АНАЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА КОРОВ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО ГЕНУ 16S рРНК

Крупин Е.О., кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом агробиологических исследований, Шакиров Ш.К., доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела агробиологических исследований, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Ключевые слова: корова, пищеварение, микробиота, секвенирование, ДНК, метабеном. **Key words:** cow, digestion, microbiota, sequencing, DNA, metagenome

РЕФЕРАТ



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. 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 скормливали отдельно, как самостоятельный компонент рациона в утреннее кормление.

Состав экспериментальной кормовой добавки разработан, а ее необходимое количество произведено в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Анализ микрофлоры рубца осуществляли методом секвенирования по гену 16S рРНК на платформе IlluminaMiSeq в Казанском (Приволжском) федеральном университете. Исследованиями установили, что применение коровам в составе рационов кормления экспериментальной кормовой добавки не оказывало видимого влияния на состав микрофлоры рубца в целом, но повлияло на

содержание важных функциональных групп микроорганизмов родов *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Anaeroplasm* и *Ruminobacter*, обеспечивающих углеводный обмен, его интенсивность. Разница в индексе Шеннона дает основания полагать о наличии возможной зависимости продуктивного действия испытуемой кормовой добавки от равномерности распределения бактерий в рубце самих животных. Статья подготовлена в рамках государственного задания АААА-А18-118031390148-1.

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, они имеют характерные, присущие только им особенности процессов пищеварения [4].

Рубец имеет большое значение в пищеварении жвачных. 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. [2, 3]

Многие бактерии рубца являются строгими анаэробами и работа с ними не возможна в обычных лабораториях, даже с целью фундаментальных исследований. Для их идентификации следует применять современные методы, с применением которых, во многом, и получен материал, анализ которого представлен в статье [8, 10].

В последнее время 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 пони-

мание сложности и разнообразия целого ряда экосистем [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, Казанском (Приволжском) федеральном университете, ООО «Агрофирма Рассвет» Кукуморского 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 скормливали 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 [5] после завершения периода скормливания 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 мета-

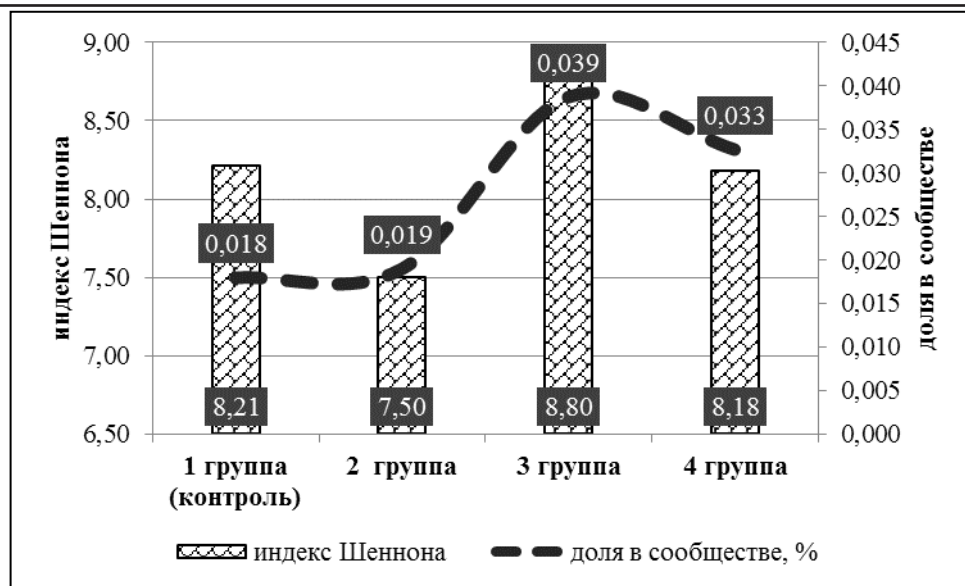


Рисунок 1. Величина индекса Шеннона и доля видов рода *Ruminococcus* в микробном сообществе рубцовой жидкости

геномные 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, 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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 (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.

Оценка количества видов микроорганизмов рода *Ruminococcus* в микробном сообществе рубцовой жидкости показала значительное их разнообразие у животных третьей и четвертой группы. 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, третьей и четвертой групп отсутствуют какие-либо зависимости от нормы ввода испытываемого кормового концентрата. Если же рассматривать влияние экспериментального кормового кон-

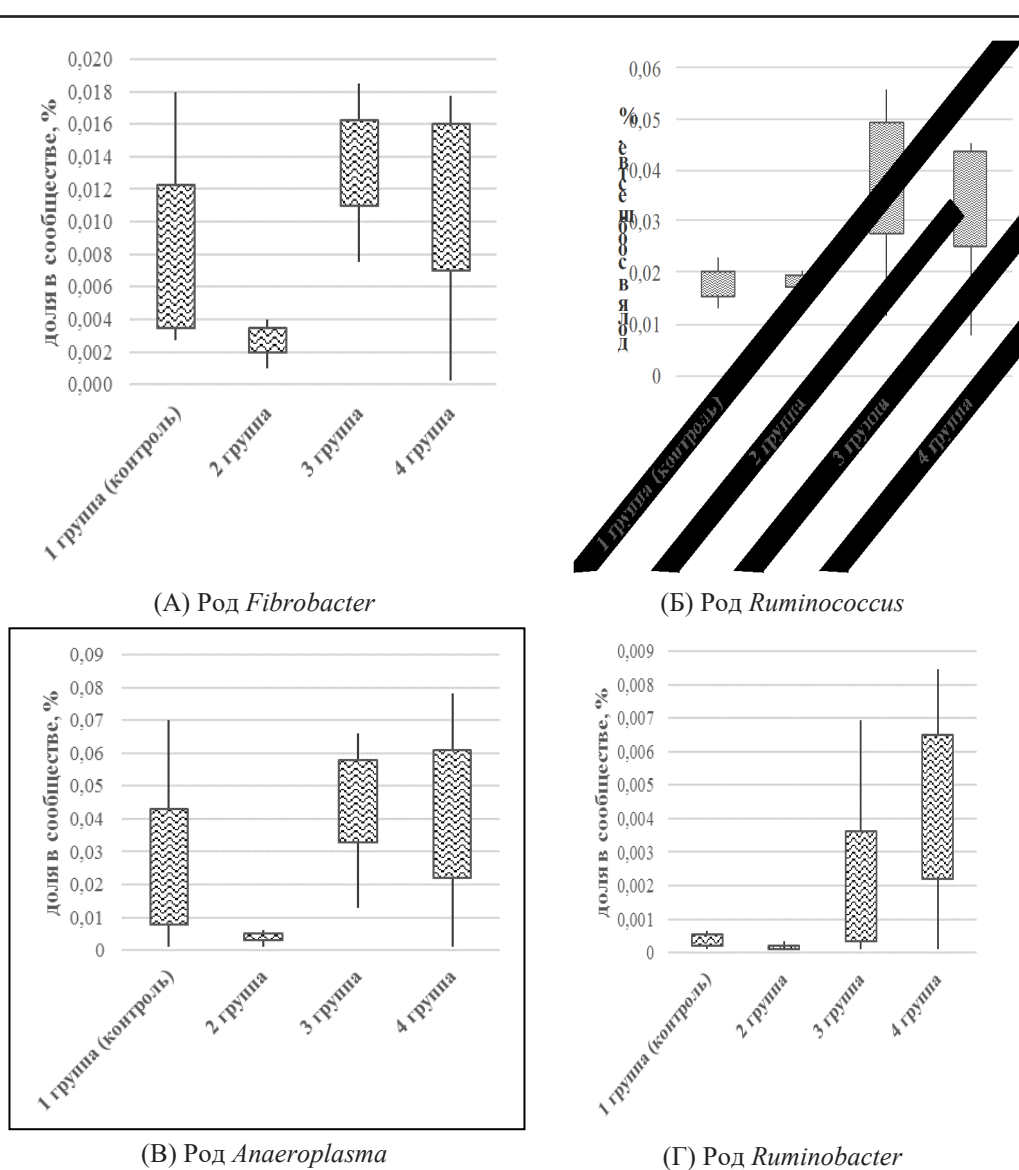


Рисунок 3. Доля родов, утилизирующих углеводы растений, в микробном сообществе рубцовой жидкости

центра 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 2). Так у животных всех групп при испытываемых дозах скармливания экс-

периментального кормового установлено повышение доли в сообществе родов *Fibrobacter* (А), *Ruminococcus* (Б), *Anaeroplasm* (В) и *Ruminobacter* (Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее равномерная представленность рубцовой микрофлоры, подтвержденная значениями индекса Шеннона,

помогла в большей степени кормовому концентрату повлиять на долю в микробном сообществе микроорганизмов рода *Ruminococcus*. 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 [9]. В этой связи 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, но действительно, микроорганизмы рода *Fibrobacter* и *Ruminococcus* являются целлюлозолитическими бактериями, бактерии рода *Anaeroplasma* также обладают способностью ферментировать широкий спектр растительных углеводов, а бактерии рода *Ruminobacter* эффективно сбраживают мальтозу и крахмал. Поэтому, возможно говорить о создании предпосылок наиболее интенсивного углеводного обмена у животных опытных групп [6].

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.

ANALYSIS OF CELLULOSOLYTIC MICROFLORA OF COWS BY CROWN METHOD OF SEQUENTIATION ON THE GENES OF 16S RRNA.

E.O.Krupin, Sh K. Shakirov

ABSTRACT

The research was carried out in TATNIISK FIC KazNC RAS, Kazan (Privolzhsky) Federal University, LLC "Agrofirma Rassvet" Kukmorsky district of the Republic of Tatarstan on milking cows of Kholmogory breed of Tatarstan type. The study continued from the 27th to the 90th day of lactation until the end of the ripening period. The animals were divided into four groups of 20 animals each. Milking cows of the first (control) group received the basic economic diet (OP). Animals of the second, third, fourth (experimental) groups received experimental feed concentrate in addition to OR. This concentrate consisted of a complex of enzymes, probiotic microorganisms, L-carnitine, spropel, taken in a certain ratio, in the amount of 100, 150 and 200 g per head per day, respectively, which was fed separately as an independent component of the ration in the morning feeding.

The composition of the experimental feed additive is developed, and its required amount is produced in Tatar Research Institute of Agriculture of FRC Kazan Scientific Center of RAS. Analysis of the rumen microflora was performed by sequencing the 16S rRNA gene on the IlluminaMiSeq platform in Kazan (Volga region) Federal University. Studies have established that the use of cows in the rations of feeding an experimental feed supplement did not have a visible effect on the composition of the rumen microflora as a whole. However, the use of experimental feed additive affected the content of important functional groups of microorganisms of the genera *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Anaeroplasma* and *Ruminobacter*. These microorganisms provide carbohydrate metabolism, 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. This

research was supported by FASO Russia project АААА-А18-118031390148-1

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Белехов Г.П., Чубинская А.А. Минеральное и витаминное питание сельскохозяйственных животных. – Л.: Колос, 1965. – 86 с.
- 2.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.
- 3.Григорьев В.С., Бакаева Л.Н. Ростовые и биологические особенности телят при разных методах кормления / Известия Самарской ГСХА. – 2012. – №1. – С. 103 – 107.
- 4.Киселев С., Петухов М. Полноценное кормление коров / Животноводство России. – 2005. – № 6. – С. 47 – 48.
- 5.Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И., Таланов Г.А., Фролова Л.А., Новиков В.Э. – М.: Колос. – 2004. – 520 с.
- 6.Пристеночная микрофлора кишечника / И.Д. Лоранская, М.Н. Болдырева, О.А. Лаврентьева, Э.В. Мулухова. – Москва: Прима Принт, 2015. – 100с.
- 7.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.
- 8.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.
9. 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.
- 10.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.