DOI
УДК 636.03+636.084/.087+ 579.8 +57.063.7

ВЛИЯНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ИЗМЕНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РУБЦОВОЙ МИКРОФЛОРЫ КОРОВ

КРУПИН Евгений Олегович, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ШАКИРОВ Шамиль Касымович, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ТАГИРОВ Марсель Шарипзянович, *ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН*
ХАРЧЕНКО Анастасия Михайловна, *Казанский (Приволжский) федеральный университет*
ГРИГОРЬЕВА Татьяна Владимировна, *Казанский (Приволжский) федеральный университет*

Приведены результаты сравнительного анализа микробиоты рубца четырех групп дойных коров холмогорской породы татарстанского типа с применением различных доз экспериментальной кормовой добавки в рационе их кормления и без таковой. Установлено, что скармливание коровам в составе рационов экспериментальной кормовой добавки не оказывало видимого влияния на состав микрофлоры рубца в целом, но влияло на содержание важных функциональных групп микроорганизмов родов Fibrobacter, Ruminococcus, Anaeroplasma и Ruminobacter, обеспечивающих углеводный обмен, его интенсивность. Разница в индексе Шеннона дает основание полагать, что возможна зависимость продуктивного действия испытуемой кормовой добавки от равномерности распределения бактерий в рубце самих животных.

Введение. Повышение молочной продуктивности животных тесно связано с нормальным течением физиологических процессов в их организме, важнейшая роль среди которых принадлежит процессам пищеварения [4, 8]. В связи с анатомо-морфологическим строением пищеварительного аппарата жвачные животные имеют характерные, присущие только им особенности процессов пищеварения [5, 6].

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. [1–3]. 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 [11, 13], с их помощью во многом и получен представленный нами материал.

В последнее годы наблюдается большое разнообразие 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 [10].

Цель данной работы – изучение влияния кормовой добавки на состав микрофлоры рубца коров.

Методика исследований. Исследования были выполнены в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, Казанском (Приволжском) федеральном университете, ООО «Агрофирма Рассвет» Кукморского района Республики Татарстан на дойных коровах холмогорской породы татарстанского типа. Опыт продолжался с 27-го по 90-й 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. Его 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 [7] после завершения периода скармливания экспериментального кормового концентрата (на 91-й 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 IlluminaMiSec. Полученные метагеномные данные анализировали с помощью QIIME pipeline с использованием базы данных Greengenes v.13.8 и RDP Classifier. Указанные исследования проводили в Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Результаты исследований. Определение содержания в рубцовой жидкости животных доли в микробном сообществе микроорганизмов рода Ruminococcus показало ее увеличение в третьей и четвертой группах (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 (рис. 1).

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

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.

Оценка количества видов микроорганизмов рода Ruminococcus в микробном сообществе рубцовой жидкости показала значительное их разнообразие у животных третьей и четвертой групп (рис. 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 со второй группой установленное увеличение составило 29,1 и 22,8 % соответственно.

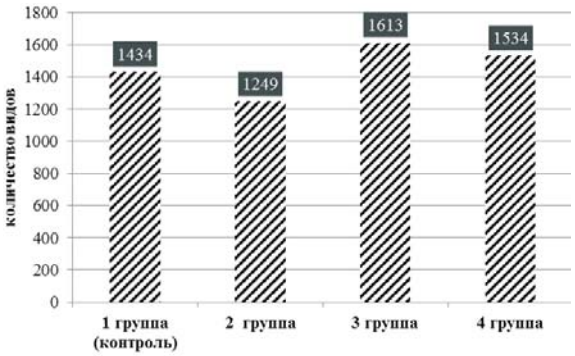

Рис. 2. Количество видов рода Ruminococcus в микробном сообществе рубцовой жидкости

Анализ всей микробиоты рубцовой жидкости в целом показал, что у животных первой, третьей и четвертой групп отсутствуют какие-либо зависимости от нормы ввода испытуемого кормового концентрата, однако животные второй группы в этом отношении являются исключением (рис. 3), о чем свидетельствует установленное распределение по координатам.

Если 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 (рис. 4). Так, у животных всех групп при испытуемых дозах скармливания экспериментальной кормовой добавки установлено повышение доли в сообществе родов Fibrobacter (А), Ruminococcus (Б), Anaeroplasma (В) и Ruminobacter (Г).

Наиболее равномерное распределение рубцовой микрофлоры, подтвержденное значениями индекса Шеннона, помогло 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 [12]. В этой связи считаем целесообразным полученные данные дополнить новыми сведениями после проведения более масштабных исследований на большем поголовье животных различных популяций для установления достоверности полученных изменений. Кроме того, отметим, что в рубце животных и его содержимом присутствует большое количество различных видов микроорганизмов, из которых не все поддаются влиянию экспериментального кормового концентрата. 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 [9]. Поэтому можно говорить о создании предпосылок наиболее интенсивного углеводного обмена у животных опытных групп.

Заключение. Применение в составе рационов кормления испытуемого кормового концентрата не оказало 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.

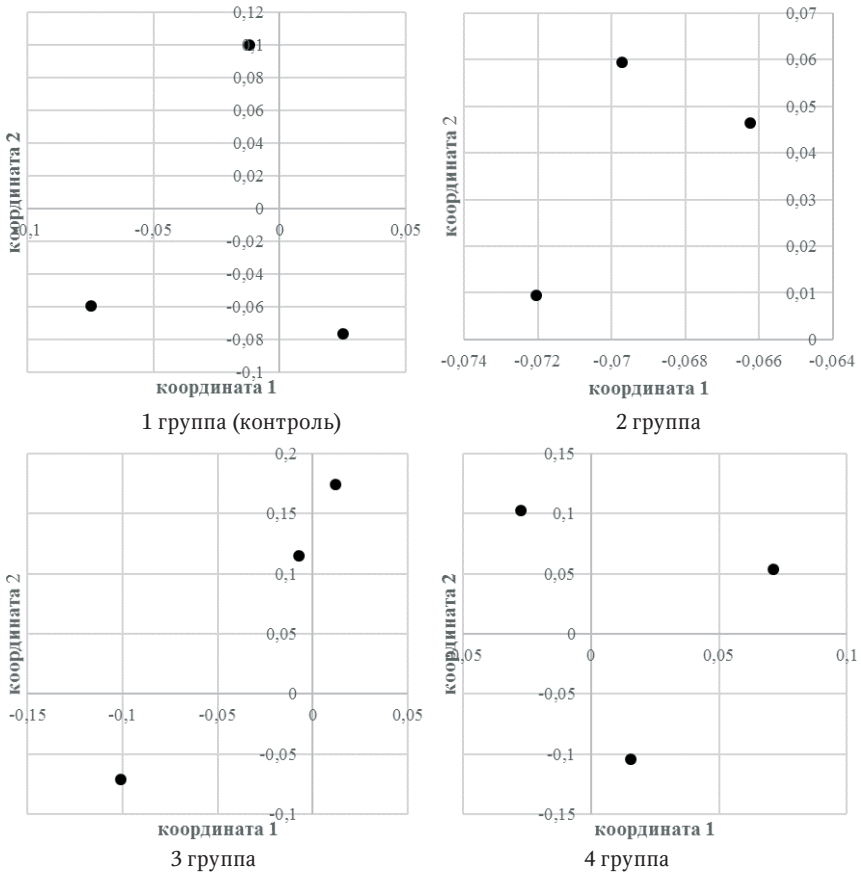

Рис. 3. Кластеризация на основе родового разнообразия микробиоты рубца дойных коров методом многомерного шкалирования

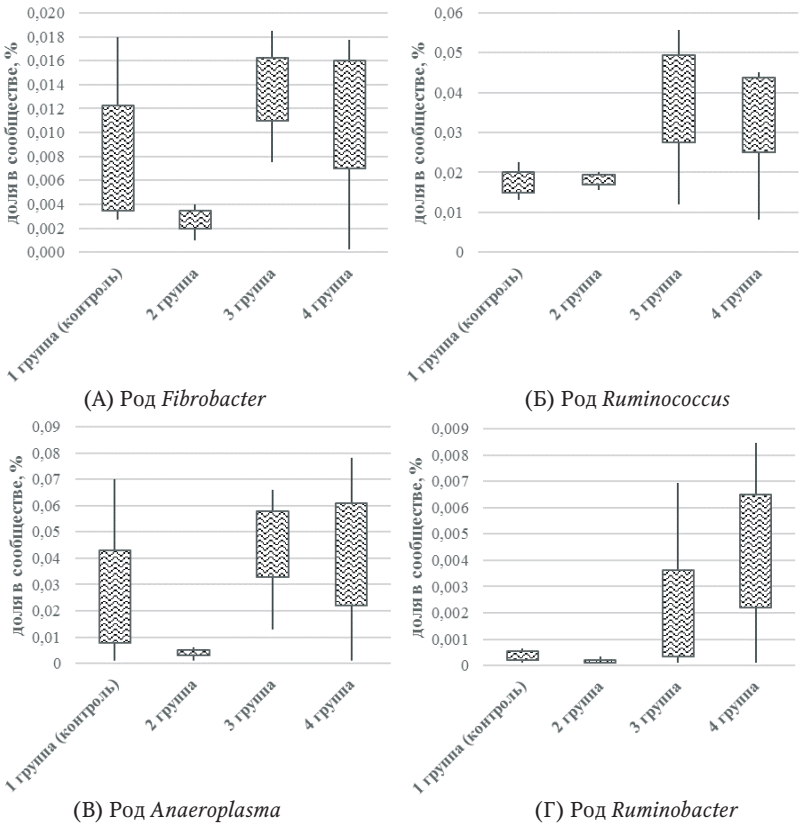

Рис. 4. Доля родов, утилизирующих углеводы растений, в микробном сообществе рубцовой жидкости

Для достоверного подтверждения установленных тенденций считаем целесообразным проведение данных исследований на большем поголовье животных различных популяций.

Статья подготовлена в рамках государственного задания АААА-А18-118031390148-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние экспериментальной кормовой добавки на активность ферментов сыворотки крови и показатели рубцовой жидкости коров / Е.О. Крупин [и др.] // Вестник Казанского ГАУ. – 2018. – № 2 (49). – С. 39–42.

2. Влияние аспарагинатов микроэлементов на метаболизм молочных коров / А.П. Коробов [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. – 2015.– № 4. – С. 31–34.

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. Использование гидропонного зеленого корма для оптимизации зимних рационов крупного рогатого скота / А.А. Васильев [и др.] //Аграрный научный журнал. – 2016. – № 3. – С. 13–16.

5. *Киселев С., Петухов М.* Полноценное кормление коров // Животноводство России. – 2005. – № 6. – С. 47–48.

6. *Коробов А.П., Москаленко С.П.* Эффективность использования сенажа из упаковки в составе кормосмеси для дойных коров // Аграрный научный журнал. – 2006. – № 2. – С. 18–20.

7. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / И.П. Кондрахин [и др.]. – М.: Колос, 2004. – 520 с.

8. *Москаленко С.П., Кузнецов М.Ю.* Рубцовое пищеварение коров при кормлении сенажом, заготовленным в пленочной упаковке // Зоотехния. – 2003. – № 7. – С. 11–12.

9. Пристеночная микрофлора кишечника / И.Д. Лоранская [и др.]. – М.: Прима Принт, 2015. – 100 с.

10. 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, Vol. 7, 1297 p.

11. *Hungate R.E.* A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // Norris J. R., Ribbons D. W. (eds). Methods in microbiology, Vol. 3B. Academic Press, London and New York, P. 117–132, 1969.

12. *Uyeno Y.T., Shigemori S., Shimosato T.* Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity // Microbes and Environments, 2015, Vol. 30, No. 2, P. 126–132.

13. 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.

Крупин Евгений Олегович, *канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник, зав. отделом агробиологических исследований, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

Шакиров Шамиль Касымович, *д-р с.-х. наук, проф., главный научный сотрудник, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

Тагиров Марсель Шарипзянович, *д-р с.-х. наук, руководитель, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.*

420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 48.

Тел.: (843) 277-81-17.

Харченко Анастасия Михайловна, *магистрант, Казанский (Приволжский) федеральный университет. Россия.*

Григорьева Татьяна Владимировна, *канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Казанский (Приволжский) федеральный университет. Россия.*

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

Тел.: (843) 233-71-09.

Ключевые слова: *корова; пищеварение; микробиота; секвенирование; ДНК; метагеном.*

INFLUENCE OF A FODDER ADDITIVE ON CHANGE OF BIODIVERSITY OF THE RUMEN MICROFLORA OF COWS

Krupin Evgeny Olegovich, *Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher, Head of Agrobiological Research Department, Tatar Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences". Russia.*

Shakirov Shamil Kasimovicn, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Chief Researcher of the Department of Agrobiological Research, Tatar Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Federal Research Center «Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences». Russia.*

Tagirov Marsel Sharipzyanovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Director, Tatar Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences". Russia.*

Kharchenko Anastisiya Mikhaylovna, *Magistrandt, Kazan (Volga region) Federal University. Russia.*

Grigorieva Tatiana Vladimirovna, *Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Kazan (Volga region) Federal University. Russia.*

Keywords: *cow; digestion; microbiota; sequencing; DNA; metagenome.*

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 are presented. The animals of the experimental groups were fed an experimental feed supplement in various doses as part of the feeding ration. 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.