

Научная статья

УДК 636.084.1

doi: <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2024i1pp96-105>

**Микробиом рубца молодняка крупного рогатого скота,
получавшего пищевые добавки с медью и травой полыни: состав и функциональный профиль**

**Елена Владимировна Шейда, Виталий Александрович Рязанов, Галимжан Калиханович Дускаев,
Шамиль Гафнуллоевич Рахматуллин**

Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук,
г. Оренбург, Россия

e-mail: elena-shejjda@mail.ru

Аннотация. Исследование направлено на изучение таксономического состава микробиоты рубца *in vivo* при дополнительном включении травы полыни и микроэлемента меди в рацион крупного рогатого скота. Трава полыни, природный источник фитобиотических веществ, улучшающих пищеварение, и биоплекс меди представлены в качестве кормовой добавки. Контрольная группа получала основной рацион (ОР), I опытная группа – ОР + полынь (2,0 г/кг СВ); II опытная группа – ОР + Cu (5,0 мг/кг СВ); III опытная группа – ОР + полынь (2,0 г/кг СВ) + Cu (5,0 мг/кг СВ). В исследованиях использовали бычков (4 гол.) породы казахская белоголовая в возрасте 14 месяцев, живой массой 360–380 кг. Опыт проводили методом латинского квадрата 4×4. После 60 дней приема добавок геномную ДНК извлекали из рубцовой жидкости и готовили для секвенирования 16S рРНК-гена, чтобы охарактеризовать состав микробиоты рубца. Результаты показали, что кормовые добавки действительно изменяли микробиом рубца телят. Индекс разнообразия Шеннона ($p \leq 0,05$) показал значительную разницу между группами. Микробиота рубца телят, в рацион которых вводили траву полыни и композицию веществ травы полыни и медь, отличалась более высоким разнообразием по сравнению с телятами, которых кормили медью (промежуточное альфа-разнообразие), и контрольной группой. Были идентифицированы дифференцированно распространенные таксоны: *Bacteroidales*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Firmicutes* ($p \leq 0,05$). Дополнительное включение меди показало, что из двенадцати родов, характеризующихся дифференциальным избытком, количество некультивируемых бактерий *Firmicutes* ($p \leq 0,05$) было наиболее дифференцированным в рубце по сравнению с контролем. Включение композиции травы полыни и меди показало разницу в количестве некультивируемых бактерий *Bacteroidales* в сторону увеличения на 12,7 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. Также в этой группе отмечено увеличение обилия представителей семейства *Candidatus Saccharibacteria*. Впервые описаны изменения таксономического состава микробиома рубца на фоне комбинированного использования растительных препаратов и минеральных веществ.

Ключевые слова: микробиом; бактерии; рубец; биоразнообразие; жвачные; медь; трава полыни

Для цитирования: Шейда Е. В., Рязанов В. А., Дускаев Г. К., Рахматуллин Ш. Г. Микробиом рубца молодняка крупного рогатого скота, получавшего пищевые добавки с медью и травой полыни: состав и функциональный профиль // Аграрный научный журнал. 2024. № 1. С. 96–105. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2024i1pp96-105>.

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECHNICS

Original article

**Microbiome of the rumen of young cattle receiving dietary supplements
with copper and wormwood grass: composition and functional profile**

Elena V. Sheida, Vitaly A. Ryazanov, Galimzhan K. Duskaev, Shamil G. Rakhmatullin

Federal Research Center of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences,
Orenburg, Russia

e-mail: elena-shejjda@mail.ru

Abstract. The study is aimed at studying the taxonomic composition of the rumen microbiota *in vivo* with the additional inclusion of wormwood grass and the trace element copper in the diet of cattle. In this study, wormwood grass, a natural source of phytobiotic substances that improve digestion, and copper bioplex were provided as





a feed additive. The control group received the main ration (OR), I experimental group – OR + wormwood (2.0 g / kg SV); II experimental group – OR + Cu (5.0 mg / kg SV); III experimental group – OR + wormwood (at a dose of 2.0 g / kg SV) + Cu (5.0 mg/kg SV). In the studies, bulls of the Kazakh white-headed breed were used, aged 14 months, with a live weight of 360–380 kg, in the amount of 4 heads. The studies were carried out using the 4×4 Latin square method. After 60 days of supplementation, genomic DNA was extracted from the scar fluid and prepared for sequencing of the 16S rRNA gene to characterize the composition of the rumen microbiota. The results showed that feed additives really changed the microbiome of the calves' rumen. The Shannon diversity Index ($p \leq 0.05$) showed a significant difference between the groups. The microbiota of the rumen of calves, in whose diet wormwood grass and the composition of wormwood grass and copper substances were introduced, differed in higher diversity compared to calves fed with copper (intermediate alpha diversity) and the control group. Differentially distributed taxa were identified: Bacteroidales, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Firmicutes ($p \leq 0.05$). Additional inclusion of copper showed that of the twelve genera characterized by differential abundance, the number of uncultivated Firmicutes bacteria ($p \leq 0.05$) was the most differentiated in the rumen compared to the control. The inclusion of wormwood and copper herb compositions showed a difference in the number of uncultivated Bacteroidales bacteria in the direction of an increase of 12.7 % ($p \leq 0.05$) compared with the control. Also in this group, an increase in the abundance of representatives of the Candidatus Saccharibacteria family was noted. Changes in the taxonomic composition of the rumen microbiome against the background of the combined use of herbal preparations and mineral substances are described for the first time.

Keywords: microbiome; bacteria; scar; biodiversity; ruminants; copper; wormwood grass

For citation: Sheida E. V., Ryazanov V. A., Duskaev G. K., Rakhmatullin Sh. G. Microbiome of the rumen of young cattle receiving dietary supplements with copper and wormwood grass: composition and functional profile. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal*. 2024;(1):96–105. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2024i1pp96-105>.

Введение. Микробиота рубца – выдающееся микробное сообщество в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Эта тщательно регулируемая экосистема позволяет жвачным животным переваривать волокнистый растительный материал, использовать его в качестве источника энергии и других метаболитов и превращать в высококачественную пищу.

У крупного рогатого скота микробиом рубца играет ключевую роль в получении продукции [1], благополучии и здоровье животных [2, 3]. Разработка не зависящих от культуры высокопроизводительных методов секвенирования следующего поколения обеспечивает прорыв в характеристике и анализе микробиомов [4], причем микробиом рубца не является исключением [5]. В частности, секвенирование гена 16S рРНК [6] является мощным методом идентификации и количественной оценки (в относительном выражении) таксономического состава микробной популяции рубца [7]. Исходя из результатов метатаксономики, можно предсказать ассоциированный метагеном и связанные с ним метаболические функции, основываясь на относительном содержании и используя базу данных функциональных аннотаций микробных генов [8, 9].

Известно, что диета изменяет состав микробиоты рубца [10, 11]. Конкретные кормовые добавки являются объектом экспериментальных испытаний на микробиоме рубца. К ним относятся рапс [12], пробиотические бактерии [13, 14], органические кислоты [15, 16], растительные жиры [17], растительные препараты и фитобиотические вещества [18].

Целью кормовых добавок является главным образом коррекция негативного влияния высококалорийных диет на процессы метаболизма в рубце и состав рубцовой микробиоты. Трава полыни горькой (*Artemisiae absinthil herba*) содержит эфирное масло (до 0,5 %), в его состав входят кислородные производные бициклических терпенов, туйиловый алкоголь-туйол, эфира туйола, эфиры туйола с уксусной, изовалериановой, пальметиновой кислотами. Из моноциклических терпенов присутствует фелландрен, а из бициклических сесквитерпенов – каденен. Полынь горькая содержит также гликозид абсинтин, каротин, аскорбиновую кислоту, флавоноиды. Классическое горько-пряное желудочное средство, возбуждающее аппетит, усиливающее и стимулирующее деятельность пищеварительных органов [19].

Медь является важным микроэлементом в рационе домашнего скота. Она изменяет микробный состав желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота [20]. Однако действие комплексных



кормовых добавок, растительных и минеральных препаратов имеет короткую историю изучения и требует дальнейших исследований.

Цель исследования – изучение влияния сочетанного воздействия травы полыни и органической формы меди на структуру и состав микробиома рубца.

Материалы и методы. Объект исследования – рубцовая жидкость, полученная от бычков казахской белоголовой породы (4 гол.), возраст 14 месяцев, с хроническими фистулами рубца, живой массой 360–380 кг. Исследования проводили методом латинского квадрата 4×4.

Кормление подопытных животных было организовано с учетом рекомендаций [21]. Рацион включал в себя сено разнотравное – 47,4 %, сено бобовое – 32,6 %, зерновую смесь – 19 %, минеральный премикс – 1,0 %. В рационе содержалось (% от СВ) сухое вещество – 94,7 %, сырой протеин – 5,9 %, сырая клетчатка – 28 %, НДК – 6,3 %, КДК – 4,6 %, гемицеллюлоза – 1,65 %, сырой жир – 2,73 %, органическое вещество – 93,4 %, Са – 0,51 %, Р – 0,37 %. Корм задавался два раза в день, и животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Схема эксперимента: контрольная группа получала основной рацион (ОР), I опытная группа – ОР + трава полыни горькой (2,0 г/кг СВ); II опытная группа – ОР + Cu (5,0 мг/кг СВ); III опытная группа – ОР + трава полыни горькой (в дозе 2,0 г/кг СВ) + Cu (5,0 мг/кг СВ). Кормовую добавку вводили в течение 60 дней (15 дней подготовительный период, 45 – учетный период). Отбор проб рубцовой жидкости проводили утром перед кормлением.

В исследованиях использовали траву полыни горькой *Artemisiae absinthil herba* (ЛСР-000171/08, ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Краснодарский край, г. Анапа, Россия); биоплекс меди – кормовая добавка, содержащая протеинат меди с концентрацией железа 15 % (комплекс меди с аминокислотами и пептидами, производитель Alltech, Сербия).

Метагеномное секвенирование. Микробное биоразнообразие содержимого рубца устанавливали с помощью MiSeq (Illumina, США) методом секвенирования нового поколения (NGS) с набором реагентов MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН). При выделении ДНК отобранную пробу содержимого инкубировали при +37 °С в течение 30 мин в 300 мкл стерильного буфера для лизиса (20 mM EDTA, 1400 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 мкл раствора лизоцима в концентрации 100 мг/мл). К смеси добавляли 10 мкл протеиназы К (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) в концентрации 10 мг/мл и SDS до конечной концентрации 1,0 % и инкубировали в течение 30 мин при +60 °С. ДНК очищали смесью фенола и хлороформа (1:1), осаждали добавлением ацетата натрия (3 M, до 10 % по объему) и трех объемов абсолютного этанола при +20 °С в течение 4 ч.

После экстракции смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1) и хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) ДНК в водной фазе осаждали 1 M ацетата аммония (до 10 % по объему) и 3-кратным объемом безводного этанола в течение 12 ч при +20 °С. Осадок ДНК отделяли центрифугированием (12 000 об/мин, 10 мин), дважды промывали 80%-м этанолом, сушили и растворяли в TE-буфере (1 M Tris-HCl, pH 8,0 – 1 мл, 0,5 M EDTA, pH 8,0 – 200 мкл, H₂O – до 100 мл; «Евроген», Россия). Чистоту экстракции оценивали по отрицательному контролю выделения (100 мкл автоклавированной деионизированной воды). Чистоту полученных препаратов ДНК проверяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле с фотометрией (NanoDrop 8000, Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Концентрацию ДНК измеряли флуориметрическим методом (прибор Qubit 2.0 с высокой чувствительностью определения dsDNA, Life Technologies, США).

ДНК-библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу Illumina, Inc. (США) с праймерами S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 к варибельному участку V3-V4 гена 16S рРНК. NGS-секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit V3 PE600 (Illumina, Inc., США). Классификацию полученных операционных таксономических единиц (ОТЕ) проводили с использованием интерактивного инструмента VAMPS и базы данных RDP (<https://vamps.mbl.edu>) 15.03.2021. Некоторые ОТЕ выравнивали с помощью алгоритма BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), используя базы данных нуклеотидных последовательностей nr/nt (National Center for Biotechnological Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и выравненных последовательностей генов рибосомальной РНК SILVA (<https://www.arb-silva.de>).

Для биоинформатической обработки результатов использовали программу PEAR (Pair-End Assembler, PEAR v0.9.8) [22].

Результаты секвенирования обрабатывали с использованием пакета анализа данных Microsoft Excel 10, программного обеспечения Microsoft Office (США).

Статистическая обработка. Числовые данные были обработаны с помощью программы SPSS Statistics 20 (IBM, США), рассчитывали средние (M), среднеквадратичные отклонения ($\pm\sigma$), ошибки стандартного отклонения ($\pm SE$). Для сравнения вариантов использовали непараметрический метод анализа. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$.

Результаты исследований. Анализ данных показал, что таксономический состав рубца молодняка крупного рогатого скота, находящегося на стандартном рационе, был представлен такими филумами, как *Bacteroidetes* (23,6 %), *Firmicutes* (69,5 %), *Fibrobacteres* (2,55 %), *unclassified_Bacteria* (3,3 %) и другие (1,04 %). Видовое разнообразие было представлено бактериями, относящимися к таким родам, как *unclassified_Firmicutes* (21,73 %), *unclassified_Lachnospiraceae* (15,9%), *unclassified_Ruminococcaceae* (12,98%), *Prevotella* (10,72%), *Butyrivibrio* (9,91%), *unclassified_Bacterioidales* (8,98 %) и другие, содержание которых не превышало 3,3 % (рис. 1).

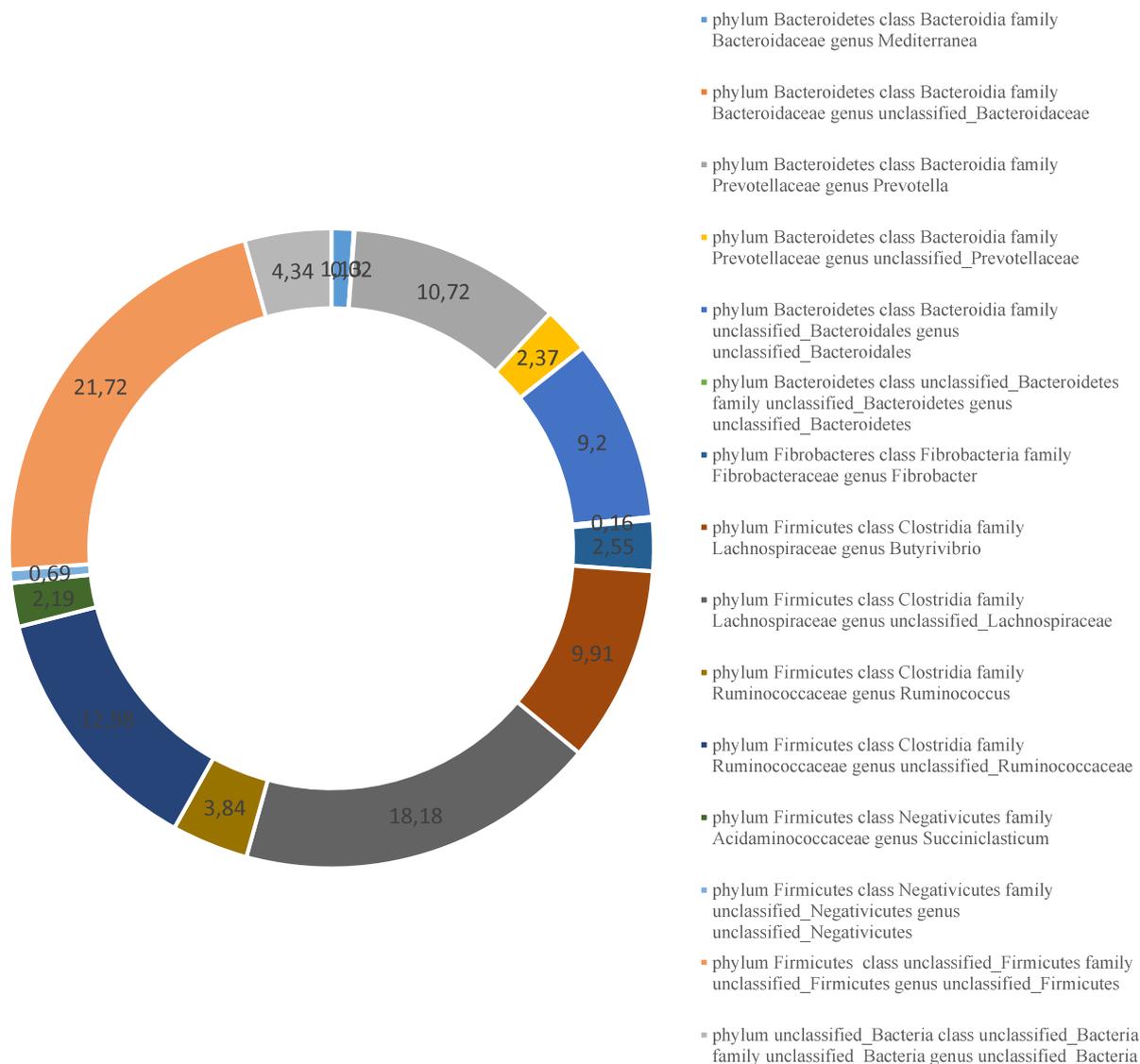
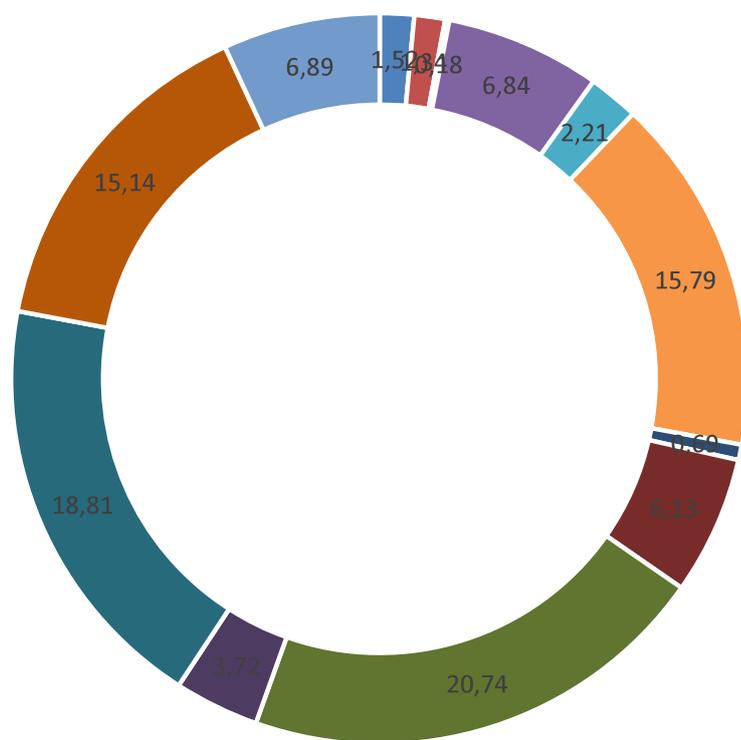


Рис. 1. Таксономическое разнообразие бактериального состава рубца крупного рогатого скота контрольной группы, %





- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Bacteroidaceae genus *Mediterranea*
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Bacteroidaceae genus *Phocaeicola*
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Bacteroidaceae genus unclassified_Bacteroidaceae
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Prevotellaceae genus *Prevotella*
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Prevotellaceae genus unclassified_Prevotellaceae
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family unclassified_Bacteroidales genus unclassified_Bacteroidales
- phylum Bacteroidetes class unclassified_Bacteroidetes family unclassified_Bacteroidetes genus unclassified_Bacteroidetes
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus *Butyrivibrio*
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus unclassified_Lachnospiraceae
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus *Ruminococcus*
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus unclassified_Ruminococcaceae
- phylum Firmicutes class unclassified_Firmicutes family unclassified_Firmicutes genus unclassified_Firmicutes
- phylum unclassified_Bacteria class unclassified_Bacteria family unclassified_Bacteria genus unclassified_Bacteria

Рис. 2. Таксономическое разнообразие бактериального состава рубца крупного рогатого скота I группы при использовании травы полыни в рационе, %
Rice. 2. Taxonomic diversity of the bacterial composition of the rumen of cattle of group I when using wormwood grass in the diet, %

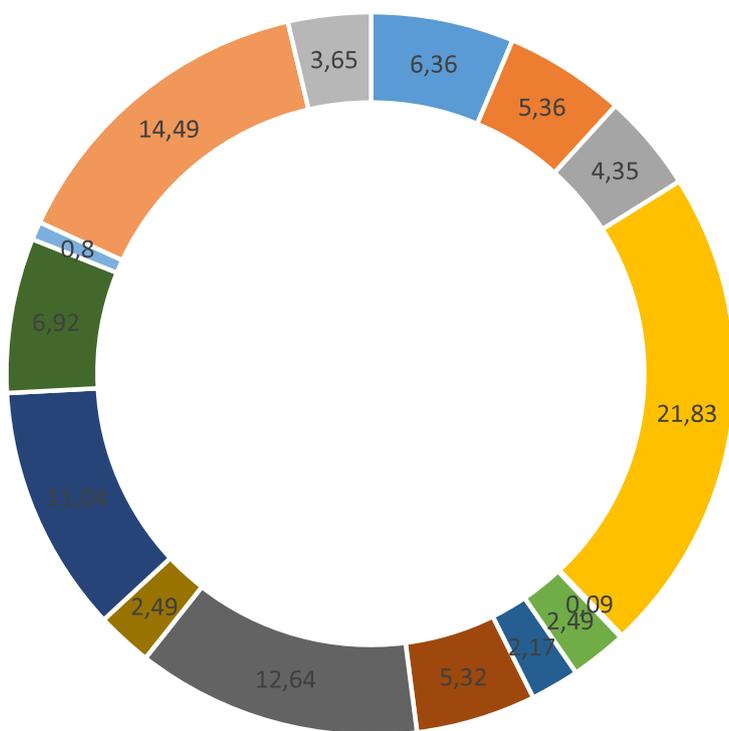
Rice. 1. Taxonomic diversity of the bacterial composition of the rumen of cattle in the control group, %

Внесение травы полыни в рацион не изменяло видовую структуру бактериального сообщества рубца, однако в данной группе отмечали повышение числа бактерий, относящихся к филуму *Bacteroidetes* (на 4,97 % от контроля). При этом зафиксировано снижение численности представителей филумов *Firmicutes* (на 5,03 % относительно контроля), *unclassified_Bacteria* (на 0,36 % относительно контроля). При этом численность *Fibrobacteres* в опытной группе была менее 2 % (рис. 2).

Изменения видового состава были связаны с повышением количества бактерий, относящихся к таким родам, как *unclassified_Bacteroidales*, *unclassified_Lachnospiraceae*, *unclassified_Ruminococcaceae* (на 5,23; 2,8; 5,83 % выше чем в контроле), и со снижением относительно контроля числа микроорганизмов *Prevotella* (на 3,88 %), *Butyrivibrio* (на 3,78 %), *unclassified_Firmicutes* (на 8,31 %).

Включение в рацион молодняка крупного рогатого скота препарата меди показало преобладание филумов *Firmicutes*, доля которого составила 73,76 % и *Bacteroidetes* – 18,86 %. Относительно контроля в данной группе повышалась численность *Fibrobacteres* на 0,68 % (рис. 3).





- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Bacteroidaceae genus Mediterranea
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Prevotellaceae genus Prevotella
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Prevotellaceae genus unclassified_Prevotellaceae
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family unclassified_Bacteroidales genus unclassified_Bacteroidales
- phylum Bacteroidetes class unclassified_Bacteroidetes family unclassified_Bacteroidetes genus unclassified_Bacteroidetes
- phylum Candidatus Saccharibacteria class Candidatus Saccharibacteria family Candidatus Saccharibacteria genus Saccharibacteria_genera_incertae_sedis
- phylum Fibrobacteres class Fibrobacteria family Fibrobacteraceae genus Fibrobacter
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus Butyrivibrio
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus unclassified_Lachnospiraceae
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus Ruminococcus
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus unclassified_Ruminococcaceae
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus unclassified_Ruminococcaceae
- phylum Firmicutes class Negativicutes family Acidaminococcaceae genus Succinilasticum
- phylum Firmicutes class Negativicutes family unclassified_Negativicutes genus unclassified_Negativicutes
- phylum Firmicutes class unclassified_Firmicutes family unclassified_Firmicutes genus unclassified_Firmicutes
- phylum unclassified_Bacteria class unclassified_Bacteria family unclassified_Bacteria genus unclassified_Bacteria

Рис. 3. Таксономическое разнообразие бактериального состава рубца крупного рогатого скота II группы при использовании микроэлемента меди в рационе, %
Rice. 3. Taxonomic diversity of the bacterial composition of the rumen of cattle of group II when using the trace element copper in the diet, %

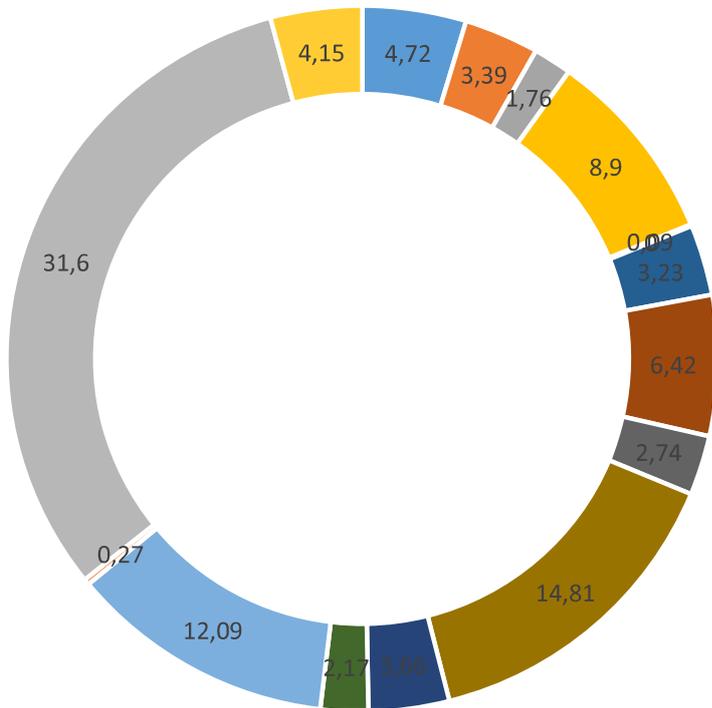
Использование в рационе композиции веществ травы полыни и Cu способствовало увеличению числа бактерий филумов *Bacteroidetes* на 14,39 % относительно контроля и *Saccharibacteria* более чем на 2 % (рис. 4).

Изменения в соотношении микроорганизмов были связаны с увеличением числа бактерий класса *Bacteroidia* (на 14,46 % от контроля), *Negativicutes* (на 4,84 %) и снижением численности класса *Clostridia* (на 13,42 %) и *unclassified_Firmicutes* (на 7,24 % от контроля).

В рамках таксона *Clostridia* относительно контрольной группы отмечалось снижение числа микроорганизмов *Ruminococcaceae* на 3,29 % и *Lachnospiraceae* на 10,1 %, тогда как в пределах таксонов *Bacteroidia* и *Saccharibacteria* отмечалось повышение численности бактерий, относящихся к родам *Mediterranea* (на 5,23 %), *unclassified_Prevotellaceae* (на 1,97 %), *unclassified_Bacterioidales* (на 12,72 %), *Saccharibacteria_genera_incertae_sedis* (более 2 %).

Таким образом, кормовая добавка, включающая в себя комплекс травы полыни и Cu, способствовала повышению в рубце представителей грамотрицательных бактерий филума *Bacteroidetes* и *Candidatus Saccharibacteria*, ферментирующих углеводы и способствующих расщеплению





- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Bacteroidaceae genus Mediterranea
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Prevotellaceae genus Prevotella
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family Prevotellaceae genus unclassified_Prevotellaceae
- phylum Bacteroidetes class Bacteroidia family unclassified_Bacteroidales genus unclassified_Bacteroidales
- phylum Bacteroidetes class unclassified_Bacteroidetes family unclassified_Bacteroidetes genus unclassified_Bacteroidetes
- phylum Candidatus Saccharibacteria class Candidatus Saccharibacteria family Candidatus Saccharibacteria genus Saccharibacteria_genera_incertae_sedis
- phylum Fibrobacteres class Fibrobacteria family Fibrobacteraceae genus Fibrobacter
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus Butyrivibrio
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus Pseudobutyrvibrio
- phylum Firmicutes class Clostridia family Lachnospiraceae genus unclassified_Lachnospiraceae
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus Ruminococcus
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus Saccharofermentans
- phylum Firmicutes class Clostridia family Ruminococcaceae genus unclassified_Ruminococcaceae
- phylum Firmicutes class Clostridia family unclassified_Clostridia genus unclassified_Clostridia
- phylum Firmicutes class unclassified_Firmicutes family unclassified_Firmicutes genus unclassified_Firmicutes
- phylum unclassified_Bacteria class unclassified_Bacteria family unclassified_Bacteria genus unclassified_Bacteria

Рис. 4. Таксономическое разнообразие бактериального состава рубца крупного рогатого скота III группы при использовании композиции травы полыни и микроэлемента меди в рационе, %
Rice. 4. Taxonomic diversity of the bacterial composition of the rumen of cattle of group III when using a composition of wormwood grass and the trace element copper in the diet, %

белков и других субстратов корма, а также увеличивала активность пищеварительных ферментов в содержимом рубца и тем самым повышала переваримость корма на 2,4 %.

Секвенирование областей V3-V4 бактериального гена 16S рНК показало в контрольной группе число идентифицированных OTU 17 642, сгруппированных в 17 филумов, 27 классов, 36 отрядов, 52 семейства и 107 родов. В I группе 15 729, 16 филумов, 29 классов, 40 отрядов, 61 семейство, 113 родов, во II группе – 13 725, 14 филумов, 25 классов, 35 отрядов, 56 семейств, количество родов было одинаковым с контрольной группой (107 родов) и в III группе – 15 483, объединенных в 13 филумов, 19 классов, 23 отряда, 34 семейства и 61 род. Максимальные различия между группами в их таксономическом составе рубца (на основе нормализованных подсчетов) наблюдались на уровне рода. Добавление полыни привело к появлению 6 новых таксонов по сравнению с контролем, а использование комплексного препарата из травы полыни и меди привело к снижению 43 % таксонов относительно контроля. При использовании травы полыни наиболее дифференцированными были некультивируемые бактерии *Bacteroidales*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Firmicutes* ($p \leq 0,05$). Дополнительное включение меди показало, что из двенадцати родов, характеризующихся дифференциальным изобилием, количество некультивируемых бактерий *Firmicutes* ($p \leq 0,05$) было наиболее дифференцированным в руб-



це по сравнению с контролем. Включение композиции травы полыни и меди показало разницу в количестве некультивируемых бактерий *Bacteroidales* в сторону увеличения на 12,7 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. Также в этой группе отмечали увеличение обилия представителей семейства *Candidatus Saccharibacteria*.

Индексы биоразнообразия для описания богатства [23, 24], разнообразия и однородности микробиоты рубца в четырех экспериментальных группах приведены в таблице.

Индексы видового разнообразия микробиоты рубца при использовании в рационе крупного рогатого скота меди и травы полыни

Indices of species diversity of rumen microbiota when using copper and wormwood grass in the diet of cattle

Индекс видового богатства	Контрольная группа	Опытная группа		
		I	II	III
Шеннона	2,39	2,5	2,46	2,47
Выравниности Пиелу	0,69	0,73	0,72	0,72
Доминирования Симпсона	0,12	0,12	0,13	0,11

Оценки богатства и видового разнообразия индекса доминирования Симпсона и выравниности Пиелу не показали существенных различий между группами. Индексы разнообразия Шеннона ($p \leq 0,05$) показали значительную разницу между группами. Микробиота рубца телят, в рацион которых вводили траву полыни и композицию веществ травы полыни и медь, отличалась более высоким разнообразием по сравнению с телятами, которых кормили медью (промежуточное альфа-разнообразие), и контрольной группой.

В целом, преобладающими бактериальными типами были *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, за которыми отдаленно следовали *Candidatus Saccharibacteria* и *Fibrobacteres*, что показывает стандартную структуру микробиоты рубца крупного рогатого скота [2, 16, 25]. Таксономический состав микробиома рубца соответствует возрастному развитию микробных сообществ у жвачных, который характеризуется увеличением количества *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [26]. Наиболее распространенными родами как в контрольной, так и опытных группах были *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Saccharofermentans* и *Firmicutes*, при включении кормовых добавок фитобиотических и минеральных веществ существенно не различались, хотя в отношении некоторых отмечена существенная разница относительно контроля ($p \leq 0,05$).

Добавление в рацион минерального микроэлемента меди, растительного препарата травы полыни и композиции данных веществ сравнивали с контрольными животными, не получавшими добавки и находящимися на стандартной диете. Определено, что добавление рапсовой муки в рацион четко дифференцировало микробиоту рубца от микробиоты контрольных животных [12]. Некоторые авторы обнаружили более высокое микробное богатство и разнообразие (альфа-индекс Фишера) при добавлении в рацион дикарбоновых кислот или полифенолов [16].

В своем исследовании мы выявили, что включение в рацион бычков фитобиотических и минеральных веществ и их композиции не оказывало существенного влияния на структуру микробиома рубца. При этом обнаружено, что микробиологическое разнообразие (индекс Шеннона) явно повышается за счет включения добавок меди и травы полыни. При рассмотрении конкретных таксонов неклассифицированные роды из групп *Bacteroidales*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* были увеличены в микробиоте бычков, получавших траву полыни. При этом также отмечено увеличение *unclassified_Bacteroidales* при добавлении меди в комплексе с травой полыни относительно контроля на 58,6 % ($p \leq 0,05$). Установлено [16] увеличение численности *Bacteroidales* в рубце молочных телок, получавших фитобиотические добавки. По некоторым данным [27], наблюдалось снижение неклассифицированных родов *Bacteroidales* в рубце бычков, получающих льняное семя.

Численность *unclassified_Firmicutes* была больше в рубце бычков, получавших добавку меди, по сравнению с добавками травы полыни и контрольной группой. Известно, что соотношение *Firmicutes: Bacteroidetes* в микробиоте кишечника играет определенную роль в адипогенезе и формировании жировой ткани [1]. В настоящем исследовании соотношение *Firmicutes*





к *Bacteroidetes* составляло 3,02 в контроле, 2,26 в группе с добавлением травы полыни, 3,9 в группе с добавлением меди и 1,4 у бычков, получавших траву полыни в комплексе с медью.

Кроме того, снижение биосинтеза липополисахаридов (ЛПС) может быть связано со снижением роста возможных патогенных для человека бактерий (например, сальмонелл, кишечной палочки) как следствие антимикробной активности добавок [16]. В образцах фекалий ягненка было описано снижение количества энтеробактерий (включая сальмонеллу, шигеллу, кишечную палочку) после добавления виноградного жмыха [28].

В целом, добавление травы полыни, по-видимому, оказывало большее влияние на микробиом рубца, чем добавление меди, с точки зрения индексов биоразнообразия, количества дифференцированно распространенных таксонов и функционального профиля.

Заключение. Добавки в корм меди и травы полыни изменяют микробиом рубца, как с точки зрения видового разнообразия, так и функций генов. Это способствует изменению процессов метаболизма в рубце. В целом, несмотря на то, что результаты были получены нами в ходе небольшого эксперимента, они представляют интересную характеристику микробиоты рубца бычков и эффектов, которые может оказывать включение меди и травы полыни в корм и позволяют рассматривать данные добавки как перспективные при выращивании молодняка крупного рогатого скота.

Исследования выполнены при поддержке РФФ №21 – 76 – 10014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Jami E., White B. A., Mizrahi I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e85423. pmid:24465556.
2. Morgavi D. P., Kelly W. J., Janssen P. H., Attwood G. T. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *Animal*. 2013;7(s1):184–201. pmid:23031271.
3. Khafipour E., Li S., Plaizier J. C., Krause D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(22):7115–24. pmid:19783747.
4. Morgan X. C., Huttenhower C., Butler R., Choudhuri J., Chuang H. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Computational Biology*. 2012;8(12):e1002808. pmid:23300406.
5. Chaucheyras-Durand F., Ossa F. Review: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *Professional Animal Scientist*. 2014;30(1):1–12.
6. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(1):e1. pmid:22933715.
7. Joshua C., McCann T. A. W., Looor J. J. High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2014;(8):109–125. pmid:24940050.
8. АЯhauer K. P., Meinicke P. On the estimation of metabolic profiles in metagenomics; 2013. Available from: <http://drops.dagstuhl.de/opus/volltexte/2013/4238/>.
9. Langille M. G. I., Zaneveld J., Caporaso J. G., McDonald D., Knights D., Reyes J. A. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*. 2013;31(9):814–821. pmid:23975157.
10. Petri R. M., Schwaiger T., Penner G. B., Beauchemin K. A., Forster R. J., McKinnon J. J. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e83424. pmid:24391765.
11. Thoetkiattikul H., Mhuantong W., Laothanachareon T., Tangphatsornruang S., Pattarajinda V., Eurwilaichitr L. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Current Microbiology*. 2013;67(2):130–137. pmid:23471692.
12. Golder H. M., Denman S. E., McSweeney C., Wales W. J., Auldism M. J., Wright M. M. Effects of partial mixed rations and supplement amounts on milk production and composition, ruminal fermentation, bacterial communities, and ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(9):5763–5785. pmid:24997657.

13. Long M., Feng W. J., Li P., Zhang Y., He R. X., Yu L. H. Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis in vitro. *Research in Veterinary Science*. 2014;96(1):28–29. PMID:24360648.
14. Таксономическая и функциональная характеристика микробиоты рубца лактирующих коров под влиянием пробиотика целлобактерина+ / Е. А. Ёылдырым [и др.]. *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. № 6. С. 1204–1219. [Yildirym E. A., Laptev G. Yu., Ilyina L. A., Dunyashev T. P., Tyurina D. G., Filippova V. A., Brazhnik E. A., Tarlavin N. V., Dubrovin A. V., Novikova N. I., Soldatova V. V., Zaitsev S. Yu. Taxonomic and functional characteristics of the rumen microbiota of lactating cows under the influence of the probiotic cellobacterin+. *Agricultural Biology*. 2020;55(6):1204–1219].
15. Nisbet D. J., Callaway T. R., Edrington T. S., Anderson R. C., Krueger N. Effects of the Dicarboxylic Acids Malate and Fumarate on *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Typhimurium Populations in Pure Culture and in Mixed Ruminal Microorganism Fermentations. *Current Microbiology*. 2009;58(5):488–492. PMID:19194750.
16. De Nardi R., Marchesini G., Li S., Khafipour E., Plaizier K. J. C., Gianesella M. Metagenomic analysis of rumen microbial population in dairy heifers fed a high grain diet supplemented with dicarboxylic acids or polyphenols. *BMC Veterinary Research*. 2016;12(1):29. PMID:26896166.
17. Шейда Е. В. Изучение влияния различных добавок на ферментативные процессы в рубце и таксономический состав микробиома // *Аграрный вестник Урала*. 2022. № 3(218). С. 72–82. [Sheyda E. V. Study of the influence of various additives on enzymatic processes in the rumen and the taxonomic composition of the microbiome. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2022;3(218):72–82].
18. Влияние растительных экстрактов на метагеном рубца / Ш. Г. Рахматуллин [и др.]. *Животноводство и кормопроизводство*. 2021. Т. 104. № 3. С. 94–103. [Rakhmatullin Sh. G., Nurzhanov B. S., Duskaev G. K., Kvan O. V., Sheyda E. V. Effect of plant extracts on the rumen metagenome. *Livestock and Feed Production*. 2021;104(3): 94–103].
19. Лекарственные растения и их применение в животноводстве: учебное пособие / В. А. Сечин [и др.]. Оренбург, 2006. 312 с. [Sechin V. A., Karakulev V. V., Gromov A. A., Zhukov A. P., Samoilov K. N., Pantelev A. P. Medicinal plants and their use in animal husbandry: textbook. Orenburg; 2006. 312 p.].
20. Faulkner M. J., Wenner B. A., Solden L. M., Weiss W. P. Source of supplemental dietary copper, zinc, and manganese affects fecal microbial relative abundance in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(2):1037–1044. PMID:27988129.
21. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных / А. П. Калашников [и др.]. М., 2003. 3-е изд. 456 с. [Kalashnikov A. P., Fisinin V. I., Shcheglov V. V., Kleimenova N. I. Norms and rations for feeding farm animals. M.; 2003. 3rd ed. 456 p.].
22. Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger. *Bioinformatics*. 2014;30(5):614–620 (doi: 10.1093/bioinformatics/btt593).
23. Shannon C. A. Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*. 1948;379–427.
24. Simpson E. H. Measurement of diversity. *Nature*. 1949;163:688.
25. Mao S., Zhang M., Liu J., Zhu W. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Scientific Reports*. 2015;5(April):16116. PMID:26527325.
26. Jami E., Israel A., Kotser A., Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*. 2013;7(6):1069–79. PMID:23426008.
27. Popova M., McGovern E., McCabe M. S., Martin C., Doreau M., Arbre M. The structural and functional capacity of ruminal and cecal microbiota in growing cattle was unaffected by dietary supplementation of linseed oil and nitrate. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(MAY):937. PMID:2859676.
28. Kafantaris I., Kotsampasi B., Christodoulou V., Kokka E., Kouka P., Terzopoulou Z. Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2017;101(5):e108–e121. PMID:27753147.

Статья поступила в редакцию 22.03.2023; одобрена после рецензирования 27.04.2023; принята к публикации 04.05.2023.

The article was submitted 22.03.2023; approved after reviewing 27.04.2023; accepted for publication 04.05.2023.

