

УДК 612.32:579:636.32/.38+636.32/.38.084.085.54

Научная статья

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-384-7-85-90

Н.С. Колесник ✉
А.А. Зеленченкова
П.С. Выючная
О.А. Артемьева

Федеральный исследовательский центр
животноводства — ВИЖ им. академика
Л.К. Эрнста, Подольск, Московская обл.,
Россия

✉ kominisiko@mail.ru

Поступила в редакцию:
11.03.2024

Одобрена после рецензирования:
02.06.2024

Принята к публикации:
17.06.2024

Research article

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-384-7-85-90

Nikita S. Kolesnik ✉
Alena A. Zelenchenkova
Polina S. Vyuchnaya
Olga A. Artemyeva

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal
Husbandry Podolsk, Moscow Region, Russia

✉ kominisiko@mail.ru

Received by the editorial office:
11.03.2024

Accepted in revised:
02.06.2024

Accepted for publication:
17.06.2024

Микробиологические показатели в рубце овец при скормлинии разного уровня концентратов

РЕЗЮМЕ

Актуальность. В статье представлены результаты исследования влияния скормливания различного уровня концентратов на микробиоту рубца у овец.

Методы. Эксперимент проведен на базе физиологического двора ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста на овцах романовской породы с хроническими фистулами рубца по Басову. Опыт проведен методом групп периодов, длительность каждого — 30 дней ($n = 6$). В первый период овцы получали сеноконцентратный рацион с содержанием 20% концентратов, во второй — 30%, в третий — 40% концентратов по питательности. В конце каждого балансового опыта у всех животных ($n = 6$) отбирались пробы рубцового содержимого для генетического исследования рубцовой микробиоты.

Результаты. Повышение концентратов до 40% привело к снижению общей микробиальной массы на 6% и 7,5% по сравнению с 20% и 30% содержания концентратов в рационе соответственно. Амилолитическая активность рубца после кормления постепенно увеличивалась с 12,73 до 14,21 Е/мл при смене рациона на более концентрированный. С увеличением доли концентратов происходит рост популяции энтерококков с максимумом при 30% концентратов. Наиболее интенсивный рост популяции лактобактерий наблюдается при скормлинии 30% концентратов ($4,78 \cdot 10^5$ КОЕ/мл против $3,18 \cdot 10^5$ КОЕ/мл при 40%). Соотношение КМАФАнМ до и после кормления оставалось постоянным с выраженным максимумом при 30% концентратов. Не удалось обнаружить устойчивую закономерность в изменении количества грибов в рубце при разном уровне концентратов в рационе. Метагеномный анализ показал увеличение количества *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Blautia* spp., *Streptococcus* spp., *Roseburia inulinivorans*, *Prevotella* spp. при снижении количества *Bifidobacterium* spp., *Methanobrevibacter smithii*, *Methanospaera stadmanae*, *Ruminococcus* spp. в рубцовом содержимом с увеличением концентратов на 20%, 30% и 40%. Наибольшее количество микроорганизмов наблюдается при скормлинии животным 30% концентратов.

Ключевые слова: овцы, микробиальная масса, метаногены, концентраты, рубец, ПЦР-ВР

Для цитирования: Колесник Н.С., Зеленченкова А.А., Выючная П.С., Артемьева О.А. Микробиологические показатели в рубце овец при скормлинии разного уровня концентратов. *Аграрная наука*. 2024; 384(7): 85–90.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-85-90>

© Колесник Н.С., Зеленченкова А.А., Выючная П.С., Артемьева О.А.

Microbiological indicators in the rumen of sheep when fed different levels of concentrates

ABSTRACT

Relevance. This article presents the results of a study of the effect of feeding different levels of concentrates on the rumen microbiota of sheep.

Methods. The experiment was carried out on the basis of the physiological yard of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry on Romanov sheep with chronic rumen fistulas according to Basov. The experiment was conducted using the method of groups of periods, the duration of each period is 30 days ($n = 6$). In the first period, the sheep received a hay-concentrate diet containing 20% concentrates, in the second — 30%, in the third — 40% of nutritional concentrates. At the end of each balance experiment, samples of ruminal contents were taken from all animals ($n = 6$) for a genetic study of the rumen microbiota.

Results. Increasing concentrates to 40% resulted in a 6% and 7.5% reduction in total microbial mass compared with 20% and 30% concentrate diets, respectively. The amyolytic activity of the rumen after feeding gradually increased from 12.73 to 14.21 U/ml when the diet was changed to a more concentrated one. With an increase in the proportion of concentrates, the population of enterococci increases with a maximum at 30% of concentrates. The most intensive growth of the lactobacilli population is observed when feeding 30% concentrates ($4.78 \cdot 10^5$ CFU/ml versus $3.18 \cdot 10^5$ CFU/ml at 40%). The ratio of QMAFAnM before and after feeding remained constant with a pronounced maximum at 30% concentrates. It was not possible to detect a consistent pattern in the change in the number of fungi in the rumen at different levels of concentrates in the diet. Metagenomic analysis showed an increase in the number of *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Blautia* spp., *Streptococcus* spp., *Roseburia inulinivorans*, *Prevotella* spp., with a decrease in the number of *Bifidobacterium* spp., *Methanobrevibacter smithii*, *Methanospaera stadmanae*, *Ruminococcus* spp. in ruminal contents with an increase in concentrates by 20%, 30% and 40%. The highest contamination with microorganisms is observed when feeding animals 30% concentrates.

Key words: sheep, microbial mass, methanogens, concentrates, rumen, RT-PCR

For citation: Kolesnik N.S., Zelenchenkova A.A., Vyuchnaya P.S., Artemyeva O.A. Microbiological indicators in the rumen of sheep when fed different levels of concentrates. *Agrarian science*. 2024; 384(7): 85–90 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-85-90>

© Kolesnik N.S., Zelenchenkova A.A., Vyuchnaya P.S., Artemyeva O.A.

Введение/Introduction

Животноводство — динамично развивающаяся отрасль сельского хозяйства. Домашние жвачные являются важными животными — производителями белка и вносят огромный вклад в удовлетворение растущего спроса человека на высококачественную продукцию [1]. В свою очередь, продуктивность и здоровье животных напрямую зависят от микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте. Исследования М.-У. Хие и соавт. продемонстрировали связь бактериального сообщества в рубце с продуктивностью молочных коров [2]. За счет разложения и ферментации корма рубцовая микробиота обеспечивает организм микробиальным белком и витаминами, играя существенную роль в метаболизме животного-хозяина [3].

Микробиом рубца представляет собой сложную многофункциональную систему анаэробных микроорганизмов, состоящую из бактерий (около 95%), архей (2–5%) и эукариотов (до 1%), которые активно участвуют в процессе разложения компонентов корма [4]. Бактерии являются крупнейшим компонентом микробной биомассы в рубце, их количество составляет 10^{10} – 10^{11} клеток/мл, разнообразие бактерий в рубце оценивается в 7000 видов, из которых около 30% до сих пор не идентифицированы [5].

Амилолитические бактерии расщепляют мальтозу и крахмал до муравьиной, уксусной и янтарной кислоты. Целлюлозолитики расщепляют сложные углеводы до ди- и моносахаридов, а молочнокислые бактерии в свою очередь разлагают крахмал и сахара до молочной кислоты. Липолитические бактерии необходимы для разложения жиров до глицерина и жирных кислот (ЖК), в то время как протеолитики расщепляют белки и полипептиды до аминокислот (АК) [6]. На долю простейших может приходиться до 50% биомассы в рубце, но их роль в микробной экосистеме рубца не до конца изучена. Известно, что они измельчают и разрыхляют частицы корма, участвуют в процессах ферментации и азотистом обмене, а также способствуют механическому перемешиванию рубцовой жидкости за счет своей подвижности и относительно крупных размеров [5, 7].

Грибы микробиома рубца, представленные шестью основными родами (*Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces* и *Cyllamyces*), обладают целлюлозолитической активностью, сбраживают сахара, однако не являются обязательными участниками рубцовой экосистемы [5, 8]. Уникальной особенностью микробиоты рубца является ее синтрофное существование, при котором конечный продукт одного микробного консорциума используется другим. Побочные продукты анаэробной ферментации, такие как CO_2 и H_2 , используются рубцовыми археями для образования метана [5].

На микробиом рубца влияют генотип, индивидуальные особенности и возраст животного, его физиологическое состояние, такое как лактация, а также рацион питания, при этом кормовые факторы оказывают доминирующее влияние на состав микробного консорциума рубца [9–11]. При увеличении количества концентратов (особенно содержащих крахмал) в рационе увеличивается количество амилолитических бактерий за счет

изменения соотношения субстратов [12, 13]. Они производят пропионат вместо ацетата, изменяя таким образом соотношение «ацетат — пропионат». Из-за изменения соотношения летучих жирных кислот (ЛЖК) уменьшается количество водорода, доступного метаногенным археям, и снижается pH рубца, что еще больше ингибирует рост популяции простейших и метаногенов [14, 15].

Увеличение доли концентратов в рационе является одной из стратегий по снижению уровня выделения метана жвачными животными путем управления кормлением и питанием. Данная стратегия имеет научный и практический интерес и легко сочетается с другими способами снижения выделения CH_4 [16]. В исследовании М. Schilde и соавт. продемонстрирован эффект синергизма концентратов и 3-нитрооксипропанола (3-NOP), который является ингибитором метаногенеза [17].

Цель работы — изучить влияние скормливания различного уровня концентрированных кормов на микробиоту рубца у овец.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследования, направленные на изучение влияния уровней концентратов на рубцовую микробиоту жвачных животных, проводились методом групп-периодов на баранчиках романовской породы в возрасте 2 лет в количестве 6 голов с живой массой 55 ± 2 кг с хроническими фистулами рубца по Басову¹ в условиях физиологического двора и в лабораториях ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста в 2023 году.

Согласно схеме опыта, в первый период животным скормливали 20% концентратов, во второй — 30%, в третий — 40% концентратов от общей питательности рациона. Продолжительность каждого периода составляла 30 дней.

Основной рацион и условия содержания животных (температурный, влажностный и световой режимы, газовый состав воздуха в помещении) в исследуемые периоды были одинаковыми и в пределах зоогигиенических норм. Протокол исследования на животных был одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста (протокол от 20 марта 2023 года № 2).

Эксперименты проведены с соблюдением требований, изложенных в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 года о защите животных, использующихся для научных целей², и принципов обращения с животными согласно статье 4 ФЗ РФ № 498-ФЗ³.

В конце каждого балансового опыта у всех животных ($n = 6$) с помощью зонда отбирались пробы рубцового содержимого за 1 час до кормления и через 3 часа после кормления для исследования рубцовой микробиоты.

ПЦР-исследование проводили в лаборатории фундаментальных основ питания сельскохозяйственных животных и рыб ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста при сотрудничестве с лабораторией молекулярной генетики сельскохозяйственных животных, где за 1 час до кормления и через 3 часа после кормления в рубцовом содержимом определяли биомассу простейших и бактерий методом дифференцированного центрифугирования⁴.

¹ Оперативные методы исследований сельскохозяйственных животных. Алиев А.А. Серия: Методы физиологических исследований. Л.: Наука, Ленинградское отделение. 1974; 1–336.

² Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf).

³ Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 24.07.2023) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».

⁴ Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птиц / Б.В. Тараканов. Российская академия с.-х. наук. Всероссийский НИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. Боровск: ВНИИФБиП с.-х. животных. 1998; 145.

Для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) применяли комплект реагентов «Колонофлор-16 (премиум)» ООО «Альфа-лаб» (г. Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Интерпретацию результатов амплификации осуществляли согласно инструкции производителя. В процессе исследования были проанализированы 30 видов микроорганизмов, в том числе метаногены, общее бактериальное число и наличие генов патогенности, определяющих энтероинвазивные свойства *E. Coli*.

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили по следующим критериям: оценка морфологии и результатов микроскопии колоний, выросших на дифференциально-диагностических средах; результаты биохимической идентификации на микробиологических средах (Himedia, Индия) и панелях тест-систем (BioMerieux, Франция):

молочнокислые микроорганизмы (лакто- и бифидобактерии) — MRS и «Бифидум-среда»;

бактерии рода кишечной палочки (БГКП) — «Агар Эндо-ГРМ»;

гемолитические организмы — мясопептонный агар (МПА) с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови;

дрожжи и дрожжеподобные грибы — «Агар Сабуро» с добавлением 5% теллурита калия.

Морфологические свойства микроорганизмов определяли методом микроскопии по Граму⁵, подсчет общего числа простейших — путем микроскопического подсчета в счетной камере Горяева.

Обработку полученных данных выполняли в программе Microsoft Excel (США) с расширенным пакетом анализа данных и программы Statistica, version 13 Ru, StatSoft, Inc., 2011⁶ (США). При этом вычислены следующие величины: среднеарифметическая (*M*) и среднеквадратическая ошибка ($\pm m$), уровень значимости (*p*). Сравнительный анализ групп проводили по Тьюки-Краммеру⁷.

Результаты исследований считали высокодостоверными при $p < 0,001$ и достоверными при $p < 0,01$, $p < 0,05$. При $p < 0,1$ до $p > 0,05$ — тенденция к достоверности полученных данных. При $p > 0,1$ разницу считали недостоверной.

Результаты и обсуждения / Results and discussions

О течении микробиальных процессов в преджелудках свидетельствуют данные массы симбионтных микроорганизмов в рубцовом содержимом (табл. 1).

Содержание бактерий и простейших в исследовании изменяется в зависимости от количества вводимых концентратов. Так, к 3-му периоду численность бактерий составила 0,31 г / 100 мл, а простейших — 0,25 г / 100 мл, что на 0,05 и 0,03 г / 100 мл выше по количеству бактерий, на 0,04 и на 0,05 г / 100 мл ниже по количеству простейших по сравнению с 1-м и 2-м периодами, соответственно, до кормления животных. Через 3 часа после кормления наблюдается постепенное снижение количества бактерий с 0,37 до 0,32 г / 100 мл и увеличение простейших с 0,33 до 0,34 г / 100 мл. Повышение концентратов до 40% привело к снижению общей микробиальной массы на 6% и 7,5% по сравнению с 20% и 30% содержания концентратов в рационе соответственно.

Амилолитические бактерии, в основном стрептококки, представлены в рубце многочисленной группой. В данных опытах амилолитическая активность рубца после кормления постепенно увеличивалась (с 12,73 до 14,21 Е/мл) при смене рациона на более концентрированный.

Таким образом, результаты исследования показывают, что процент концентратов в рационе овец влияет на количественный и качественный состав микробиальной массы рубца. Данный факт в свою очередь влияет на характер ферментации и использование питательных веществ.

Бактерии играют ключевую роль в разложении полимерных углеводов в рационе животных. Фибролитические бактерии, такие как *Fibrobacter succinogenes* и *Ruminococcus flavefaciens*, специализируются на расщеплении полисахаридов целлюлозы и гемицеллюлозы [18]. Кроме того, амилолитические и лактат-использующие бактерии способствуют расщеплению крахмала и сахара, обеспечивая эффективное использование источников энергии в рубце [19]. Увеличение доли концентратов в рационе способствует замене бактерий *Firmicutes* и *Fibrobacteres*, разлагающих клетчатку, на амилолитические виды микробов *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*.

Была проведена оценка динамики изменения количества микробиальной массы рубца при скормливания животных низко- и высококонцентратного рациона путем высева десятикратных разведений на дифференциально-диагностические среды. Проведен сравнительный анализ групп по Тьюки-Краммеру. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1. Масса симбионтных микроорганизмов в рубцовом содержимом овец ($n = 6$)

Table 1. Mass of symbiont microorganisms in the rumen contents of sheep ($n = 6$)

Группа	В 100 мл рубцового содержимого, г					
	до кормления			через 3 часа после кормления		
	бактерии	простейшие	всего	бактерии	простейшие	всего
20% концентратов	0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,70 ± 0,08
30% концентратов	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,06	0,58 ± 0,07	0,34 ± 0,06	0,37 ± 0,07	0,71 ± 0,12
40% концентратов	0,31 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,66 ± 0,01

Таблица 2. Количество микробиальной массы в рубцовом содержимом в зависимости от уровня концентратов

Table 2. Amount of microbial mass in ruminal contents depending on the level of concentrates

	A	B	C	D	E	F	P-значение
Лактобактерии, IgKOE/мл	3,62 ^{AE}	5,27	3,87 ^{CE}	5,67	4,53 ^{AE}	5,48	7,54 · 10 ⁻¹⁴
Энтерококки, IgKOE/мл	4,19	4,63	4,32	5,12	4,26	5,03	4,38 · 10 ⁻⁶
КМАФАнМ, IgKOE/мл	5,16 ^{AC}	7,42 ^{BD}	8,39 ^{CE}	9,41 ^{DF}	7,13 ^{AE}	8,43 ^{BF}	1,20 · 10 ⁻²⁰
Целлюлозолит. бактерии, IgKOE/мл	6,38 ^{AE}	7,01 ^{BF}	5,89 ^{CE}	6,80 ^{DF}	7,18	8,23	6,24 · 10 ⁻¹⁰
Лактозоположительная, IgKOE/мл	2,78 ^{AC}	4,83	4,19	5,09	4,08 ^{AE}	4,60	1,18 · 10 ⁻⁸
Лактозоотрицательная, IgKOE/мл	—*	—	—	—	—	—	—
Плесени, IgKOE/мл	2,15	1,73	1,61	1,86	2,01	1,59	0,37
Дрожжеподобные грибы, IgKOE/мл	1,96 ^{AC}	2,68	2,86 ^{CE}	3,38	1,56	2,93	7,53 · 10 ⁻⁸

Примечание: А — 20% концентратов (за час до кормления); В — 20% концентратов (через 3 часа после кормления); С — 30% концентратов (за час до кормления); D — 30% концентратов (через 3 часа после кормления); Е — 40% концентратов (за час до кормления); F — 40% концентратов (через 3 часа после кормления); КМАФАнМ — количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов; * микроорганизмы не обнаружены.

⁵ ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.

⁶ www.statsoft.com

⁷ Тьюки Д.В. Анализ результатов наблюдений. М.: Мир 1981.

Стоит отметить, что количественное соотношение некоторых групп микроорганизмов до и после кормления сохраняется. Так, наименьшее количество энтерококков (4,19 IgKOE/мл) наблюдается при низкоконцентратном рационе до кормления, 4,63 IgKOE/мл — после. С увеличением доли концентратов происходит рост популяции данных микроорганизмов с максимумом при 30% концентратов (4,32 IgKOE/мл до кормления и 5,12 IgKOE/мл через 3 часа после кормления). Достоверных различий между группами до кормления (А, С, Е) и после (В, D, F) не обнаружено. Количество лактобактерий значительно увеличивается при переходе на высококонцентратный рацион за счет увеличения доли поступающих в организм углеводов. Лактобактерии в рубце ферментируют моносахара до молочной кислоты, снижая pH рубца [6], что в свою очередь способствует угнетению активности метаногенных архей.

До кормления наибольшее количество данной группы бактерий (4,53 IgKOE/мл) наблюдалось при 40% концентратов, однако после кормления рост популяции лактобактерий при скормлинии 30% концентратов был более интенсивным по сравнению с высококонцентратным рационом (5,67 IgKOE/мл против 5,48 IgKOE/мл). Наблюдаются достоверные различия между группами А, С и Е (табл. 2). Соотношение КМАФАнМ до и после кормления оставалось постоянным с выраженным максимумом при 30% концентратов. Стоит отметить, что были обнаружены достоверные различия между всеми изучаемыми группами по данному показателю. Не удалось обнаружить устойчивую закономерность в изменении количества грибов в рубце при разном уровне концентратов в рационе.

Грибы рубца не являются обязательными обитателями и у некоторых животных не обнаруживаются. Тем не менее они обладают очень высоким потенциалом разложения клетчатки, поскольку кодируют множество ферментов, разрушающих растительные волокна [4]. Количество дрожжеподобных грибов увеличивалось с переходом на более концентрированные рационы, однако интенсивность их роста значительно отличалась.

Установлены достоверные различия между группами «А — С» и «С — Е». Количество плесеней при 20% и 40% концентратов после кормления значительно снижалось, в то время как при 30% наблюдался рост популяции данных микроорганизмов.

Наиболее противоречивые данные были получены по содержанию целлюлозолитических бактерий. Увеличение доли концентратов в рационе способствует изменению соотношения субстратов для рубцовой микробиоты, что приводит к снижению числа целлюлозолитиков и росту популяции амилолитиков. При увеличении количества концентратов (особенно содержащих крахмал) в рационе снижается количество целлюлозолитических бактерий и увеличивается количество амилолитических бактерий за счет изменения соотношения субстратов [12, 13].

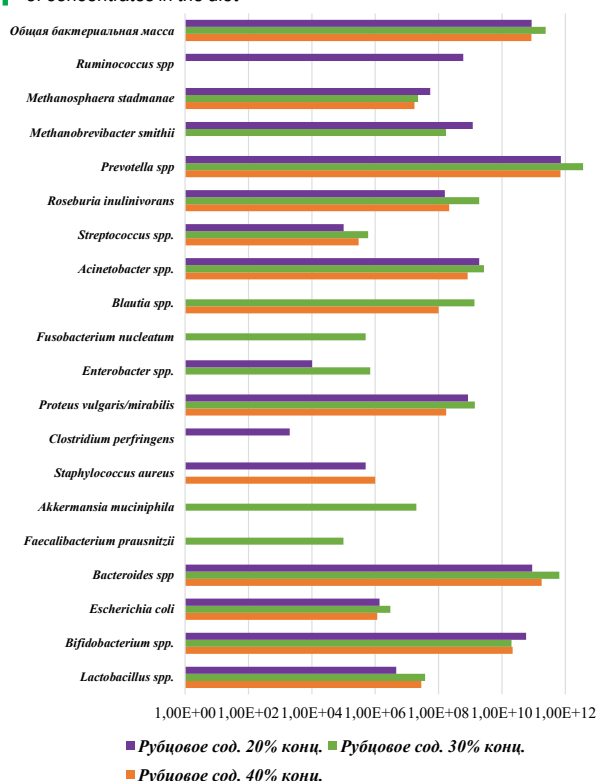
Однако, по данным авторов, наблюдается значительный рост количества целлюлозолитических бактерий при скормлинии 40% концентратов, в то время как при 20% и 30% концентратов в рационе их содержание изменяется незначительно, что требует дальнейшего изучения.

Была проанализирована динамика изменения состава рубцовой микробиоты овец романовской породы с увеличением концентратов на 20%, 30% и 40% методом ПЦР-РВ (рис. 1).

Количество *Lactobacillus spp.* при потреблении 30% и 40% концентратов выросло, соответственно, на 14,6% и

Рис. 1. Микробиота рубцового содержимого овец ($n = 6$) при разном уровне концентратов в рационе

Fig. 1. Microbiota of sheep rumen contents ($n = 6$) at different levels of concentrates in the diet



12,4% относительно низкоконцентратного рациона, количество же *Bifidobacterium spp.* с увеличением доли концентратов снизилось на 5,1%. Наибольшая численность *Bacteroides spp.* наблюдается при 30% концентратов и составляет примерно $8,6 \cdot 10^{11}$. Аналогично количеству *Prevotella spp.* и *Roseburia inulinivorans* при низко- и высококонцентратном типе кормления оставалось неизменным, однако наблюдался рост данных бактерий при скормлинии 30% концентратов.

С увеличением ввода концентратов увеличивается количество *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Blautia spp.*, *Streptococcus spp.*, *Roseburia inulinivorans*, *Prevotella spp.*, при этом снижается количество *Bifidobacterium spp.*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanospaera stadmanae*, *Ruminococcus spp.* в рубцовом содержимом, что в целом характерно для сеноконцентратного типа кормления. *Prevotella*, *Butyrivibrio* и *Ruminococcus*, а также неклассифицированные *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* и *Clostridiales* являются основными видами бактерий в рубце, и изменения в рационе могут влиять на общую структуру их сообщества [20]. *Prevotella* и неклассифицированные *Succinivibrionaceae*, вероятно, являются основными производителями пропионата и сукцината (предшественника пропионата), поэтому ответственны за более высокие уровни пропионата, образующегося в результате диеты, богатой концентратами [21], что наблюдается в данных исследованиях.

Производство метана в рубце в первую очередь связано с метаболической активностью метаногенных архей, которые представляют собой специализированные микроорганизмы, генерирующие метан в качестве побочного продукта. Яркие примеры метаногенных архей, обнаруженных в рубце, включают *Methanobrevibacter smithii*, *Methanospaera stadmanae*, *Methanomicrobium mobile* и *Methanosarcina spp.* [22, 23]. Эти археи

используют H_2 , CO_2 и метанол для синтеза метана [24]. Однако определенные виды бактерий в рубце вносят свой вклад в процесс ферментации, предоставляя субстраты, поддерживающие метаногенез [25].

В данных исследованиях с увеличением уровня концентратов снижается количество основных метаногенов, а именно *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosphaera stadtmanae*. Наиболее зависящими от концентратного типа кормления оказались *Methanobrevibacter smithii*. Их количество заметно сократилось в рубцовом содержимом при вводе 40% концентратов.

В целом полученные данные путем посева на дифференциально-диагностические среды (табл. 2) соотносятся с результатами, от метода ПЦР (рис. 1). Наибольшее количество микробной массы наблюдается при скормлинии 30% концентратов.

Выводы/Conclusion

Амилолитическая активность рубцовой жидкости после кормления постепенно увеличивалась с 12,73 до

14,21 Е/мл при смене рациона на более концентрированный. Повышение в рационе концентратов до 40% привело к снижению общей микробной массы на 6% и 7,5% по сравнению с 20% и 30% содержания концентратов в рационе соответственно.

Метагеномный анализ показал увеличение количества *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Blautia spp.*, *Streptococcus spp.*, *Roseburia inulinivorans*, *Prevotella spp.* при снижении количества *Bifidobacterium spp.*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Ruminococcus spp.* в рубцовом содержимом с увеличением концентратов на 20%, 30% и 40%. С увеличением уровня концентратов снизилось количество метаногенов *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosphaera stadtmanae* в рубце.

Полученные методом ПЦР-РВ данные соотносятся с результатами посева на дифференциально-диагностических средах. Наибольшее количество микроорганизмов наблюдается при скормлинии животным 30% концентратов.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные. Все авторы внесли равный вклад в работу. Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках реализации национального проекта «Наука и университеты» (FGGN-2022-0009).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Clark S., García M.B.M. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(12): 10026–10044. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287>
- Xue M.-Y., Sun H.-Z., Wu X.-H., Liu J.-X., Guan L.L. Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. *Microbiome*. 2020; 8: 64. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00819-8>
- Jiang Q. et al. Metagenomic insights into the microbe-mediated B and K₂ vitamin biosynthesis in the gastrointestinal microbiome of ruminants. *Microbiome*. 2022; 10: 109. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01298-9>
- Мирошникова М.С. Основные представители микробиома рубца (обзор). *Животноводство и кормопроизводство*. 2020; 103(4): 174–185. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-103-4-174>
- Lan W., Yang C. Ruminant methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment*. 2019; 654: 1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.180>
- Колоскова Е.М., Остренко К.С., Езерский В.А., Овчарова А.Н., Белова Н.В. Исследование микробиома рубца у овец с использованием молекулярно-генетических методов (обзор). *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2020; 4: 5–26. <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.4.5-26>
- Радчиков В.Ф. и др. Процессы в пищеварении и использование питательных веществ корма при разном соотношении расщепляемого и нерасщепляемого протеина. Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве. Материалы Международной научно-технической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика С.И. Назарова. Минск: Белорусская наука. 2023; 240–245. <https://elibrary.ru/kngqhw>
- Ishaq S.L., Kim C.J., Reis D., Wright A.-D.G. Fibrolytic Bacteria Isolated from the Rumen of North American Moose (*Alces alces*) and Their Use as a Probiotic in Neonatal Lambs. *PLoS ONE*. 2015; 10(12): e0144804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144804>
- Dieho K. et al. Changes in rumen microbiota composition and in situ degradation kinetics during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(4): 2695–2710. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11982>
- Vasta V. et al. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*. 2019; 102(5): 3781–3804. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985>
- Ellison M.J. et al. Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*. 2017; 156: 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.009>
- Li F., Cao Y., Liu N., Yang X., Yao J., Yan D. Subacute ruminal acidosis challenge changed in situ degradability of feedstuffs in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 2014; 97(8): 5101–5109. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7676>

All authors bear responsibility for the work and presented data. All authors made an equal contribution to the work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

The study was carried out with financial support from the Russian Ministry of Education and Science as part of the national project "Science and Universities" (FGGN-2022-0009).

REFERENCES

- Clark S., García M.B.M. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(12): 10026–10044. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287>
- Xue M.-Y., Sun H.-Z., Wu X.-H., Liu J.-X., Guan L.L. Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. *Microbiome*. 2020; 8: 64. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00819-8>
- Jiang Q. et al. Metagenomic insights into the microbe-mediated B and K₂ vitamin biosynthesis in the gastrointestinal microbiome of ruminants. *Microbiome*. 2022; 10: 109. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01298-9>
- Miroshnikova M.S. The main representatives of the rumen microbiome (review). *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2020; 103(4): 174–185 (in Russian). <https://doi.org/10.33284/2658-3135-103-4-174>
- Lan W., Yang C. Ruminant methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment*. 2019; 654: 1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.180>
- Koloskova E.M., Ostrenko K.S., Yezersky V.A., Ovcharova A.N., Belova N.V. Studies of the sheep rumen microbiome using molecular genetic methods: a review. *Problems of Productive Animal Biology*. 2020; 4: 5–26 (in Russian). <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.4.5-26>
- Radchikov V.F. et al. Processes in digestion and the use of feed nutrients with a different ratio of cleavable and non-cleavable protein. *Scientific and technological progress in agricultural production. Proceedings of the International scientific and technical conference dedicated to the 95th anniversary of the birth of Academician S.I. Nazarov*. Minsk: Belorusskaya nauka. 2023; 240–245 (in Russian). <https://elibrary.ru/kngqhw>
- Ishaq S.L., Kim C.J., Reis D., Wright A.-D.G. Fibrolytic Bacteria Isolated from the Rumen of North American Moose (*Alces alces*) and Their Use as a Probiotic in Neonatal Lambs. *PLoS ONE*. 2015; 10(12): e0144804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144804>
- Dieho K. et al. Changes in rumen microbiota composition and in situ degradation kinetics during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(4): 2695–2710. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11982>
- Vasta V. et al. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*. 2019; 102(5): 3781–3804. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985>
- Ellison M.J. et al. Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*. 2017; 156: 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.009>
- Li F., Cao Y., Liu N., Yang X., Yao J., Yan D. Subacute ruminal acidosis challenge changed in situ degradability of feedstuffs in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 2014; 97(8): 5101–5109. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7676>

13. Petri R.M., Forster R.J., Yang W., McKinnon J.J., McAllister T.A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 112(6): 1152–1162.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05295.x>
14. Fouts J.Q., Honan M.C., Roque B.M., Tricarico J.M., Kebreab E. Enteric methane mitigation interventions. *Translational Animal Science*. 2022; 6(2): txac041.
<https://doi.org/10.1093/tas/txac041>
15. Ribeiro Pereira L.G. et al. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2015; 28(2): 124–143.
<https://doi.org/10.17533/UDEA.RCCPV28N2A02>
16. Vargas J., Ungerfeld E., Muñoz C., DiLorenzo N. Feeding Strategies to Mitigate Enteric Methane Emission from Ruminants in Grassland Systems. *Animals*. 2022; 12(9): 1132.
<https://doi.org/10.3390/ani12091132>
17. Schilde M., von Soosten D., Hühner L., Meyer U., Zeyner A., Dänicke S. Effects of 3-nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on methane emission, rumen fermentation and performance of periparturient dairy cows. *Archives of Animal Nutrition*. 2021; 75(2): 79–104.
<https://doi.org/10.1080/1745039X.2021.1877986>
18. Flint H.J., Bayer E.A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6(2): 121–131.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>
19. Carpinelli N.A. et al. Effects of periparturient yeast culture supplementation on lactation performance, blood biomarkers, rumen fermentation, and rumen bacteria species in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2021; 104(10): 10727–10743.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-20002>
20. Henderson G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*. 2015; 5: 14567.
<https://doi.org/10.1038/srep14567>
21. Russell J.B., Rychlik J.L. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. *Science*. 2001; 292(5519): 1119–1122.
<https://doi.org/10.1126/science.1058830>
22. Moissl-Eichinger C., Pausan M., Taffner J., Berg G., Bang C., Schmitz R.A. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology*. 2018; 26(1): 70–85.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>
23. Skillman L.C., Evans P.N., Strömpl C., Joblin K.N. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 42(3): 222–228.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01833.x>
24. Welander P.V., Metcalf W.W. Loss of the *mtr* operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(30): 10664–10669.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0502623102>
25. Greening C. et al. Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *The ISME Journal*. 2019; 13(10): 2617–2632.
<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>

ОБ АВТОРАХ

Никита Сергеевич Колесник

младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных основ питания сельскохозяйственных животных и рыб
kominisiko@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4267-5300>

Алёна Анатольевна Зеленченкова

старший научный сотрудник, заведующая лабораторией фундаментальных основ питания сельскохозяйственных животных и рыб, кандидат сельскохозяйственных наук
aly4383@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8862-3648>

Полина Сергеевна Вьючная

младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных основ питания сельскохозяйственных животных и рыб
vyuchnaya@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0008-4669-2395>

Ольга Анатольевна Артемьева

ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией микробиологии, кандидат биологических наук
vijmikrob@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7706-4182>

Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, г. о. Подольск, Московская обл., 142132, Россия

13. Petri R.M., Forster R.J., Yang W., McKinnon J.J., McAllister T.A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 112(6): 1152–1162.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05295.x>
14. Fouts J.Q., Honan M.C., Roque B.M., Tricarico J.M., Kebreab E. Enteric methane mitigation interventions. *Translational Animal Science*. 2022; 6(2): txac041.
<https://doi.org/10.1093/tas/txac041>
15. Ribeiro Pereira L.G. et al. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2015; 28(2): 124–143.
<https://doi.org/10.17533/UDEA.RCCPV28N2A02>
16. Vargas J., Ungerfeld E., Muñoz C., DiLorenzo N. Feeding Strategies to Mitigate Enteric Methane Emission from Ruminants in Grassland Systems. *Animals*. 2022; 12(9): 1132.
<https://doi.org/10.3390/ani12091132>
17. Schilde M., von Soosten D., Hühner L., Meyer U., Zeyner A., Dänicke S. Effects of 3-nitrooxypropanol and varying concentrate feed proportions in the ration on methane emission, rumen fermentation and performance of periparturient dairy cows. *Archives of Animal Nutrition*. 2021; 75(2): 79–104.
<https://doi.org/10.1080/1745039X.2021.1877986>
18. Flint H.J., Bayer E.A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6(2): 121–131.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>
19. Carpinelli N.A. et al. Effects of periparturient yeast culture supplementation on lactation performance, blood biomarkers, rumen fermentation, and rumen bacteria species in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2021; 104(10): 10727–10743.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-20002>
20. Henderson G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*. 2015; 5: 14567.
<https://doi.org/10.1038/srep14567>
21. Russell J.B., Rychlik J.L. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. *Science*. 2001; 292(5519): 1119–1122.
<https://doi.org/10.1126/science.1058830>
22. Moissl-Eichinger C., Pausan M., Taffner J., Berg G., Bang C., Schmitz R.A. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology*. 2018; 26(1): 70–85.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>
23. Skillman L.C., Evans P.N., Strömpl C., Joblin K.N. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 42(3): 222–228.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01833.x>
24. Welander P.V., Metcalf W.W. Loss of the *mtr* operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(30): 10664–10669.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0502623102>
25. Greening C. et al. Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *The ISME Journal*. 2019; 13(10): 2617–2632.
<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>

ABOUT THE AUTHORS

Nikita Sergeevich Kolesnik

Junior Researcher at the Laboratory of Fundamental Principles of Nutrition of Farm Animals and Fish
kominisiko@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4267-5300>

Alena Anatolyevna Zelenchenkova

Senior Researcher, Head of the Laboratory of Fundamental Principles of Nutrition of Farm Animals and Fish, Candidate of Agricultural Sciences
aly4383@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8862-3648>

Polina Sergeevna Vyuchnaya

Junior Researcher at the Laboratory of Fundamental Principles of Nutrition of Farm Animals and Fish
vyuchnaya@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0008-4669-2395>

Olga Anatolyevna Artemyeva

Leading Researcher, Head of the Microbiology Laboratory, Candidate of Biological Sciences
vijmikrob@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7706-4182>

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,

60 Dubrovitsy, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132, Russia