

МРНТИ: 34.15.23, 68.39.29

С.Т. ДАУГАЛИЕВА^{1*}, А.Т. ДАУГАЛИЕВА², А.И. АШАНИН², Б.Б. ЕРҒАЛИ²¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан²Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства, Алматы, Казахстан

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ БЫЧКОВ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ И КОНЦЕНТРАЦИЮ АРХЕЙ В МИКРОБИОМЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.15

Аннотация

В статье приводятся сведения о влиянии рациона с добавлением семян льна на продуктивность бычков казахской белоголовой породы и выработку ими метана. Выработка метана зависит от концентрации архей в микробиоме желудочно-кишечного тракта животных. В результате проведенных исследований установлено, что введение семян льна в рационы бычков способствует привесам и увеличению выработки метана. Так, абсолютный прирост живой массы в опытной группе составил $124,5 \pm 6,95$ кг, в контрольной группе – $105,33 \pm 2,16$ кг. Использование семян льна привело к увеличению количества анаэробных бактерий и архей, то есть к увеличению выработки метана. На уровне семейств статистически значимая вариация численности метаногенов на 3-м месяце по сравнению с животными до кормления семенами льна, начала эксперимента, точки отсчета (T0), была подтверждена для *Methanocorpusculaceae* (увеличение в 255 раз), *Methanomethylophilaceae* (увеличение в 13 раз) и *Methanobacteriaceae* (увеличение в 6 раз).

Ключевые слова: микробиом, крупный рогатый скот, казахская белоголовая, семена льна, секвенирование нового поколения.

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

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

Однако, когда увеличивается доля концентрата в рационе, показатели pH в рубце снижаются, что сдерживает рост архей и инфузорий, при этом увеличивается выработка пропионовой кислоты. Ряд авторов установили, что состав органического вещества (углеводов) в рационе животных влияет на характер и скорость ферментации, а также на образование незаменимых жирных кислот (НЖК) и метана [3-5]. Рационы с крахмалом стимулируют продукцию пропионата и снижают выработку метана. Такие рационы влияют

на pH рубца и образование метана. Рационы с содержанием грубых кормов имеют обратное действие. Влияние состава рациона на эмиссию метана установили и другие учёные [6, 7]. В Индии установлено, что Голштинские коровы питаются качественными рационами и продуцируют в 6–7 раз меньше метана на 1 л молока, чем местные, что позволяет снизить эмиссию метана на 20–30% за счёт поголовья [8]. Другим способом снижения метаногенеза в рубце может быть ингибирование за счёт образования альтернативных продуктов. Так, ацетогенные бактерии в толстом кишечнике млекопитающих продуцируют уксусную кислоту при редукции CO_2 с участием H_2 , образуемого в процессе ферментации углеводов в толстом кишечнике [9]. Обогащение рациона животных жирами ведёт к уменьшению инфузий в рубце и снижению метана, причём источник жира влияет на эффективность его действия [10, 11, 12]. Показано ингибирование метаногенеза при добавлении жиров (например, семян льна) к рациону [13]. При добавлении к корму пробиотика из гриба *Aspergillus oryzae* уменьшается образование метана в рубце на 50%, что связано со снижением количества инфузий в рубцовом содержимом (на 45%) [14]. Добавление *Saccharomyces cerevisiae in vitro* в инкубационную систему ведёт к сокращению метана на 10%, в то время как добавление *in vivo* — не влияет на неё [15]. Разложение растительной клетчатки происходит в результате гидролиза полисахаридов на мономеры. Мономеры ферментируются ацидогенезом, что приводит к образованию органических и короткоцепочечных жирных кислот. Также образуются водород (H_2) и углекислый газ (CO_2). Метаногены удаляют H_2 путём восстановления CO_2 с образованием метана [16, 17]. Поэтому понимание микробного состава желудочно-кишечного тракта жвачных животных важно для оценки степени выработки метана. Разработка диеты для крупного рогатого скота с целью снижения эмиссии метана и его негативного воздействия на окружающую среду является актуальной глобальной экологической проблемой.

Материалы и методы

Исследования влияния добавления семян льна в рацион на микробиоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) коров проводились в к/х «Кулдыбаев Даулетгали», Каратальского района, Жетысуской области, в испытательном центре по определению химического состава кормов и качества продукции ТОО «КазНИИЖиК и в лаборатории молекулярно-генетических исследований ТОО «НПЦ Микробиологии и вирусологии». В качестве объекта исследования служили бычки казахской белоголовой породы в возрасте 8–10 мес. со средней начальной живой массой 180–210 кг и среднесуточным приростом 1100–1200 г. Кормовая база была представлена сеном разнотравным, силосом кукурузным, кукурузой, отрубями пшеничными. Химический анализ кормов проводили согласно ГОСТ 32040–2021 г. Для изучения химического состава кормов использовался прибор Инфразак фирмы FOSS (Дания). Животных содержали на открытых площадках, без привязи. Кормление осуществлялось дважды в сутки. После изучения химического состава кормов и формирования подопытных групп с учётом живой массы и среднесуточных приростов животных были разработаны рационы для подопытных групп. При создании рационов были использованы нормы кормления сельскохозяйственных животных, разработанные ВГНИИ животноводства [18]. В ходе опыта один раз в месяц проводился учёт продуктивности животных и поедаемости кормов. Количественные данные были обработаны методом вариационной статистики [19]. В соответствии со стандартными значениями критерия достоверности (по Стьюденту) применялись три уровня вероятности: 0,95; 0,99 и 0,999. При $P < 0.95$ различия между группами считались не достоверными. Если уровень вероятности выше указанных показателей, то различия считались достоверными с ошибкой в 0,05; 0,01 и 0,001%.

Исследование микробиома бычков проведено с помощью 16S метагеномного анализа на секвенаторе Illumina MiSeq по технологии секвенирования нового поколения (NGS). Для анализа были отобраны образцы фекалий ректально. Образцы были собраны у трех бычков до кормления рационом с семенами льна (T0), а затем в первый, второй и третий месяцы

после кормления. Кроме того, в опыт в качестве контроля были включены три животных, которым семена льна не давали. Образцы были доставлены в лабораторию в термочемодане с хладоэлементами и хранились при -20°C [20]. Для выделения ДНК было взято 250 мг образцов фекалий. ДНК выделяли набором для выделения ДНК микробиома PureLink™ (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Генетические библиотеки для метагеномного 16S секвенирования были подготовлены в соответствии с руководством (№ 15044223 rev. A). Готовые библиотеки с PhiX секвенировали с помощью набора MiSeq® Reagent Kit v3 на 600 циклов (Illumina Inc., США).

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

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

Результаты и обсуждение

В результате исследования кормов установлено, что качество кормов в к/х «Кулдыбаев Даулетгали» было средним. Так, сено разнотравное по содержанию сырого протеина и сырой золы следует отнести к 1-му классу, по содержанию сырой клетчатки - ко 2-му классу. Однако по содержанию сухого вещества сено не является классным. Силос кукурузный в соответствии с ГОСТ Р 55986–2014 по содержанию сухого вещества, сырого протеина и сырой клетчатки отнесен к 1-му классу, а по концентрации сырой золы в сухом веществе корма – к 3-му классу. Для проведения научно-хозяйственного опыта было сформировано две подопытные группы бычков по 10 голов в каждой по принципу пар аналогов [21] (таблица 1).

Таблица 1 – Схема научно-хозяйственного опыта на бычках

Группа	Количество голов	Условия кормления
Контрольная	10	Базовый рацион (БР)
Опытная	10	БР + зерно льна

Отличие рационов подопытных групп животных заключалось в том, что опытная группа в рационе получала семена льна. При этом грубые корма в структуре рациона контрольной группы занимали 22,0%. На сочные корма приходилось 20,0%. Доля концентрированных кормов составляла 58,0%. Аналогичная структура рационов была и в опытной группе. Так, на долю грубых кормов приходилось 22,5%, на долю сочных – 19,5%. Доля концентратов в рационе составляла 58,0 %. В том числе на семена льна приходилось 9,2%. Поедаемость сена в контрольной группе составила 86,3%, силоса - 96,47%, концентраты поедались полностью. В опытной группе поедаемость сена составила 86,43%,

силоса кукурузного - 96,5%, концентраты поедались полностью. Из полученных данных следует, что поедаемость кормов была одинаковой в обеих группах. В среднем, в сутки животные обеих групп потребляли одинаковое количество сухого вещества (7,53 кг). При этом потребление энергии было выше в опытной группе на 5,13%, сырого протеина - на 2,0%, перевариваемого протеина - на 3,14%, а сырого жира - на 56,6%, что связано с введением в рацион семян льна в количестве 500 г на голову в сутки. Введение в рацион опытной группы семян льна оказало положительное влияние на продуктивность животных. Так, абсолютный прирост живой массы в опытной группе составил $124,5 \pm 6,95$ кг, а в контрольной группе - $105,33 \pm 2,16$ кг. Превышение составило 19,17 кг или 18,2 относительных процента ($P > 0,95$). Среднесуточный прирост живой массы в опытной группе был выше и составил $1270,40 \pm 70,94$ г. против $1074,8 \pm 22,01$ г. Превышение составило 195,6 г или 18,2 относительных процента ($P > 0,95$). Такая разница связана с тем, что рационы опытной группы содержали в составе больше энергии, сырого и перевариваемого протеина и жира. Увеличение среднесуточных приростов живой массы бычков опытной группы показало эффективность затрат кормов на 1 кг прироста живой массы. Так, в контрольной группе они составили 7,26 ЭКЕ (энергетических кормовых единиц), а в опытной - 6,45 ЭКЕ или меньше на 0,81 ЭКЕ, что составило 12,6%. Наряду с этим, изучено содержание анаэробных бактерий и архей в фекалиях подопытных животных. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание анаэробных бактерий и архей в фекалиях подопытных животных, %

Микробиота	Группа бычков		Уровень вероятности
	КГ	ОГ	
Анаэробные бактерии	$98,67 \pm 0,18$	$99,52 \pm 0,03$	$P > 0,95$
Археи	$0,02 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,01$	$P > 0,999$

Из данных таблицы 2 следует, что наиболее высокая концентрация архей содержится в опытной группе ($0,2 \pm 0,01\%$) по сравнению с контрольной группой бычков ($0,02 \pm 0,01$), увеличение - 0,18 абсолютных процента или в 10,0 раз ($P > 0,999$). Анализ полученных данных показал, что введение семян льна в рационы бычков способствует увеличению количества анаэробных бактерий при одновременном повышении концентрации архей.

В результате проведения биоинформатической обработки получены сгенерированные кластеры OTU, которые предоставлены на рисунке 1.

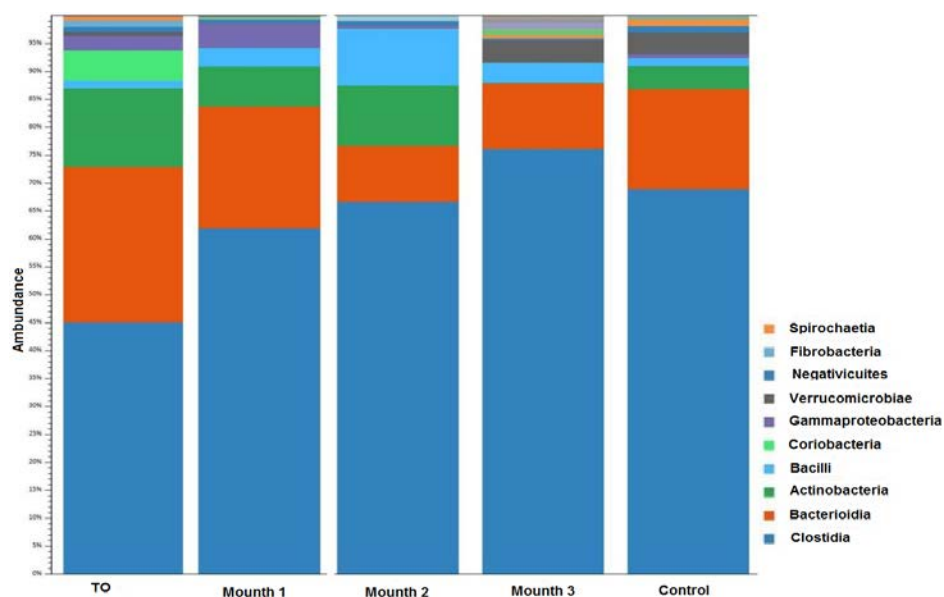


Рисунок 1 – Микробиота бычков на уровне класса в образцах, сгруппированных по кормлению семенами льна

На рисунке 1 показано увеличение численности *Clostridia* с T0 по 3-й месяц кормления семенами льна, тогда как количество *Bacteroidia* уменьшается. Эти результаты были дополнительно оценены путём проведения статистического анализа образцов.

Альфа-разнообразие нанесено на диаграмму путём группировки образцов введения семян льна (рисунок 2).

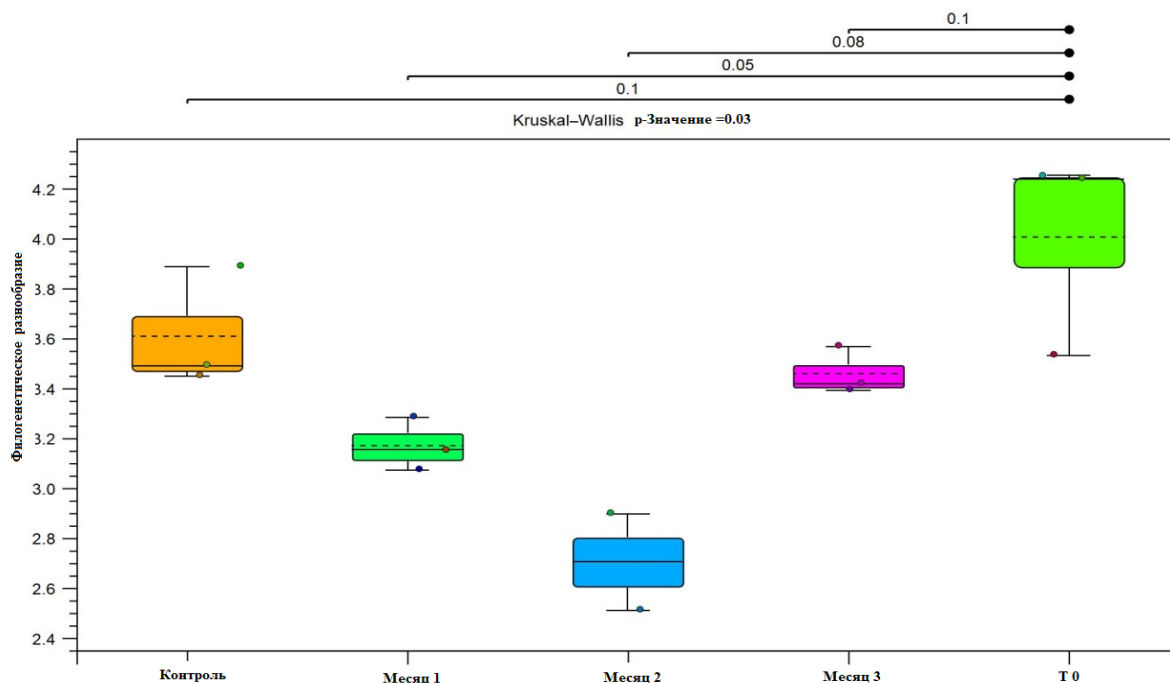


Рисунок 2 - Альфа-разнообразие – прямоугольная диаграмма при кормлении льном

Рисунок показывает значительное разделение групп кормления ($p=0,03$).

Анализ бета-разнообразия показывает анализ основных координат (PCoA) на расстояниях UniFrac (рисунок 3).

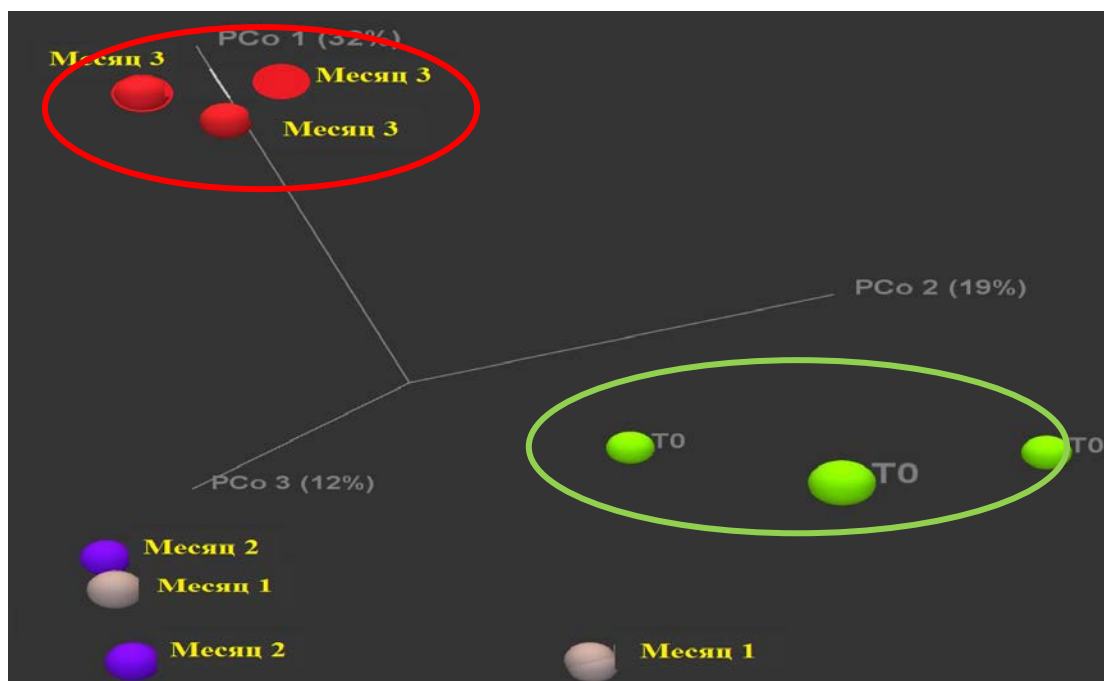


Рисунок 3 - Результат анализа бета-разнообразия — PCoA

В РСоА сферы бета-разнообразия на графике окрашены в соответствии с метаданными (кормление рационом с семенами льна). Интересно, что в этом анализе микробиота в Т0 и через 3 месяца после кормления семенами льна чётко сгруппирована в два разных кластера. Животные через 1 и 2 месяца также отделены от первых групп, но имеют тенденцию смешиваться друг с другом. РСоА предполагает постепенное изменение состава микробиоты после кормления семенами льна.

Таблица 3 - Результат пермутационного многомерного дисперсионного анализа (ПЕРМАНОВА) анализ (Брай Кертис)

Группы			Псевдостатистика	p-значение
			2.50489	0.00246
Группа 1	Группа 2	Псевдостатистика	P-значение	P-значение (Бонферрони)
До	Месяц 2	0,78822	0,90000	1,00000
До	Месяц 2	1,62391	0,10000	1,00000
Месяц 2	Месяц 3	2,18331	0,10000	1,00000
До	Контроль	2,06822	0,10000	1,00000
Месяц 2	Контроль	4,79052	0,10000	1,00000
Месяц 3	Контроль	11,24487	0,10000	1,00000
До	Месяц 1	1,03102	0,50000	1,00000
Месяц 2	Месяц 1	0,78543	0,60000	1,00000
Месяц 3	Месяц 1	5,38830	0,10000	1,00000
Контроль	Месяц 1	5,03025	0,10000	1,00000
PERMANOVA анализ (Жаккард)				
Переменная	Группы		Псевдостатистика	p-значение
Кормление	До, Месяц 2, Месяц 3, Контроль, Месяц 1		2,17219	0,00051
Группа 1	Группа 2	Псевдостатистика	P-значение	P-значение (Бонферрони)
До	Месяц 2	0,92241	0,80000	1,00000
До	Месяц 2	1,98391	0,10000	1,00000
Месяц 2	Месяц 3	1,97859	0,10000	1,00000
До	Контроль	1,69119	0,10000	1,00000
Месяц 2	Контроль	2,97312	0,10000	1,00000
Месяц 3	Контроль	6,45427	0,10000	1,00000
До	Месяц 1	1,18759	0,20000	1,00000
Месяц 2	Месяц 1	0,85116	0,60000	1,00000
Месяц 3	Месяц 1	3,95923	0,10000	1,00000
Контроль	Месяц 1	3,20675	0,10000	1,00000

Метаногены. Биоинформатический анализ проводился на 3-х таксономических уровнях: класс, семейство и род.

Для проверки наличия разницы между двумя группами проведён дифференциальный анализ численности архей (таблица 4). Результат этого анализа показал 6-кратное и 285-кратное увеличение численности архей классов *Methanobacteria* и *Methanomicrobia*, соответственно, после введения в рацион семян льна в течение 3-х месяцев. Эти значения статистически подтверждены, поскольку показатели p значительно ниже порогового значения ($p < 0,05$).

Таблица 4 - OTU Дифференциальный анализ численности на уровне класса

Наименование класса	Изменение сгиба	P-значение
<i>Methanobacteria</i>	5,91	7,95E-3
<i>Methanomicrobia</i>	258,21	1,54E-3

Тот же подход применён на уровне семейств и родов (рисунок 4), что подтверждает увеличение содержания метаногенов на 3-м месяце по сравнению с животными до кормления семенами льна (T0). В частности, метаногенный компонент микробиоты желудочно-кишечного тракта КРС идентифицирован как семейства *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylophilaceae* и как роды *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*.

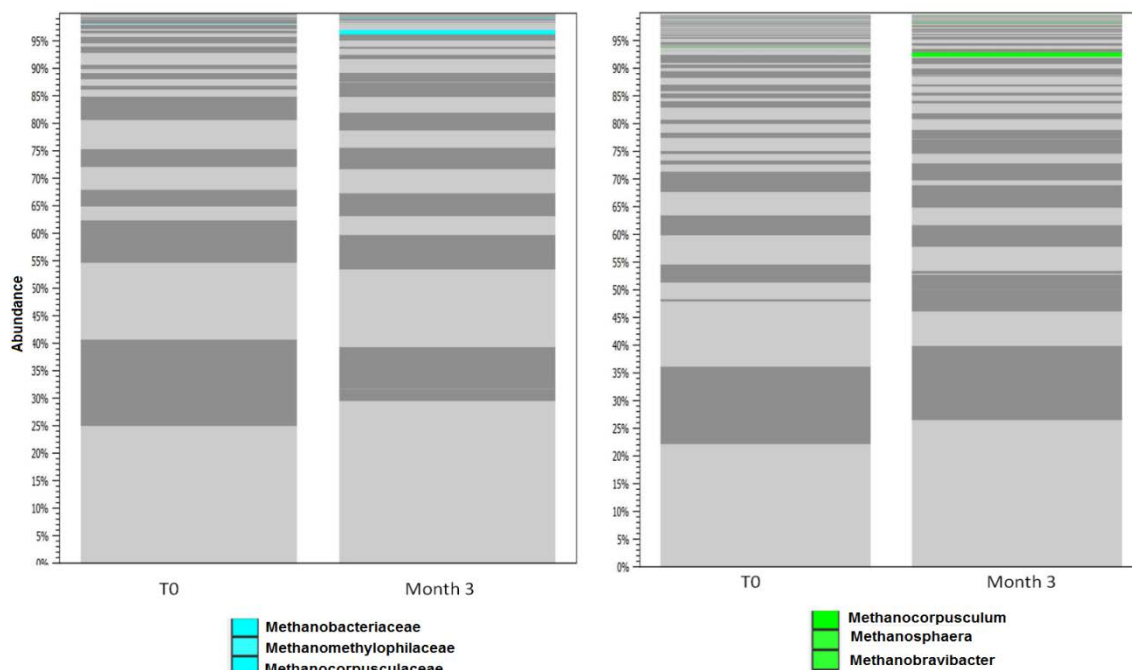


Рисунок 4 - Микробиота бычков на уровнях семейств и родов архей в образцах, сгруппированных по кормлению семенами льна. Компонент метаногена окрашен в светло-голубой и зелёный цвета

Точно так же дифференциальный анализ численности был выполнен для семейств и родов метаногенов (таблицы 5, 6). На уровне семейства статистически значимая вариация численности на 3-м месяце по сравнению с животными до кормления семенами льна (T0) была подтверждена для *Methanocorpusculaceae* (увеличение в 255 раз) и *Mathanobacteriaceae* (увеличение в 6 раз). Результаты также показали 13-кратное увеличение *Methanomethylophilaceae*.

Таблица 5 - OTU Дифференциальный анализ численности на уровне семейств архей

Наименование	Изменение сгиба	P-значение
<i>Methanocorpusculaceae</i>	254,81	1,36E-3
<i>Methanobacteriaceae</i>	6,05	0,02
<i>Methanomethylophilaceae</i>	12,72	0,07

Таблица 6 - OTU Дифференциальный анализ численности на уровне родов архей

Наименование	Изменение сгиба	P-значение
<i>Methanocorpusculum</i>	166,92	0,08
<i>Methanosphaera</i>	-1,51	0,52
<i>Methanobrevibacter</i>	1,00	0,98

Создана тепловая карта (рисунок 5), включающая все экспериментальные группы (контроль, до кормления семенами льна (T0), месяц 1, 2, 3) на основе таблицы операционных таксономических единиц (OTU), чтобы сохранить всю таксономическую информацию в анализе.

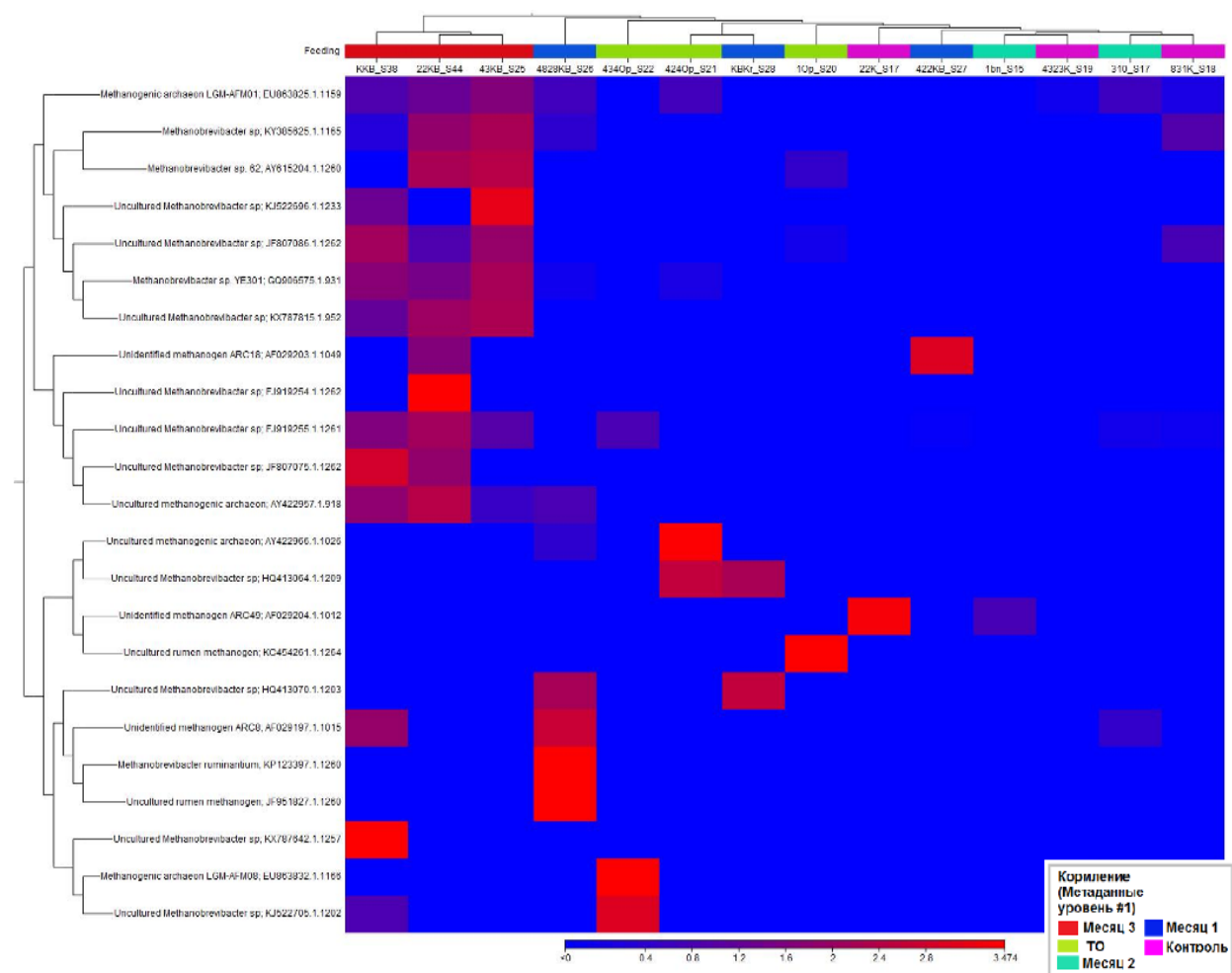


Рисунок 5 - Тепловая карта таблицы OTU по метаногенам

Этот анализ также весьма информативен, так как показывает, что увеличение метаногенов незначительно до 2-х месяцев после кормления семенами льна, в то время как с третьего месяца начинает увеличиваться метаногенная составляющая микробиоты желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота.

Заключение

В опытной группе бычков, в рационе которых были семена льна, наблюдался больший прирост живой массы по сравнению с контрольной группой. В результате проведенного метагеномного анализа выявлено, что введение семян льна в рационы бычков способствует увеличению количества анаэробных бактерий и архей (семейств *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylophilaceae* и родов *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*), что способствует повышению продуктивности бычков, но в то же время повышается эмиссия метана, что негативно влияет на окружающую среду. Необходимо проведение дальнейших исследований для разработки рационов с целью уменьшения выработки метана.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP09259133).

Литература:

- 1 Коровы как источник парникового эффекта? 2016. URL: <https://ru.euronews.com/methane-gas-threatening-to-slow-efforts-to-slow-climate-change>.
- 2 Upreti D.C., Subash Dhar, Dong Hongmin, Bruce A., Kimball Amit Garg, Jigeesha Upadhyay. *Технологии для смягчения последствий изменения климата*. Нью-Дели, 2012. 141 с.
- 3 Лучка І.В., Богданов, Г.О., Сологуб Л.І., Федяков Р.О., Герасимів М.Г. Вплив вуглеводів та їх метаболітів на метаноутворення і продукцію летких жирних кислот мікроорганізмами рубця телят. В сб.: *НТБ Інституту біол. наук УААН*. К., 2004: 53-56.
- 4 Лучка І.В., Богданов Г.О., Сологуб Л.І., Янович В.Г., Герасимів М.Г. Утворення метану в рубці великого рогатого худоби Західної України за різного типу годівлі. В сб.: *НТБ Інституту біол. наук УААН*. К., 2005: 77-80.
- 5 Мелікян С.М., Лучка, І.В., Сологуб Л.І. До ренуляція редукцій нітратів і утворення метану у рубці телят. В сб.: *НТБ Інституту біол. наук УААН*. К., 2006: 188-192.
- 6 Moss A.R. Methane production by ruminants — literature review: I. Dietary manipulation to reduce methane production. *Laboratory procedures for estimating methane potential of diets Nutrition Abstracts and Reviews*, 1994, 64:786-806.
- 7 Lana R.P., Russell J.B., Van Amburgh M.E. The role of pH in regulating methane and ammonia production. *Animal Science*, 1998, 76:2190-2196 (doi: 10.2527/1998.7682190x).
- 8 Fahey G.C., Berger L.L. Carbohydrate nutrition in ruminants. In: *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition*. D.C. Church (ed.). В сб.: *Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey*, 1988: 269-297.
- 9 Demeyer D.I., De Graeve K. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1991, 22: 50-61.
- 10 Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. The effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54:544-547 (doi.org/10.1128/aem.54.2.544-547.1988).
- 11 Czerkawski J.W., Christie W.W., Breckenridge G., Hunter, M.L. Changes in rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *British Journal of Nutrition*, 1995, 34: 25-44 (doi: 10.1017/s0007114575000074).
- 12 Machmuller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuzer M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 1998, 77:117-130 (doi: 10.1016/S0377-8401(97)00126-0).
- 13 Dohme F., Machmuller A., Estermann B.L., Wasserfalle, A., Kreuzer, M. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 2: 187-193 (doi: 10.3389/fmicb.2015.01313).
- 14 Frumholtz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *The Journal of Agricultural Science (Camb.)*, 1989, 113:169-172.
- 15 Mathieu F., Jouany J.P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, 1996, 36, 271-287 (doi: 10.1051/rnd:19960305).
- 16 Ishler, V., Heinrichs J., Varga G. *From feed to milk: understanding rumen function*. The Pennsylvania State University, 1996.
- 17 Morgavi D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold C.J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 2021, 6 (5): 871 (doi: 10.1017/S1751731110000546).
- 18 Калашников А.П., Фисинин В.И., Щеглов В.В. *Нормы и рационы кормления с.-х. животных*. М., 2003. 305 с.
- 19 Яковенко А.М., Антоненко Т.И., Селионова М.И. *Биометрические методы анализа качественных и количественных признаков в зоотехнии*. М., 2013. 91 с.
- 20 Shoukun J., Hongtao Zh., Hui Y., Arash A., Haitao Shi., Gibson A., Shengl L., Zhijun C., and Yajing W. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta rumen liquid and

solid fractions in lactating in Holstein cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8:16 (doi: 10.1186/s40104-017-0142-z).

21 Овсяников А.И. *Основы опытного дела в животноводстве*. М., 1976. 304 с.

С.Т. ДАУГАЛИЕВА^{1*}, А.Т. ДАУГАЛИЕВА², А.И. АШАНИН², Б.Б. ЕРҒАЛИ²

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Қазақ мал шаруашылығы және жемшөп өндірісі ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ЗЫҒЫР ТҰҚЫМЫМЕН АЗЫҚТАНДЫРУДЫҢ ҚАЗАҚТЫҢ АҚБАС ТҰҚЫМЫ БҰҚАШЫҚТАРЫНЫҢ АСҚАЗАН-ІШЕК ЖОЛЫ МИКРОБИОМАСЫНДАҒЫ АРХЕЙЛЕРДІҢ ӨНІМДІЛІГІ МЕН ШОҒЫРЛАНУЫНА ӘСЕРІ

Түйін

Мақалада зығыр тұқымы қосылған рационның қазақтың ақбас тұқымды бұқалардың өнімділігіне және олардың метан өндіруіне әсері туралы ақпарат берілген. Метан бөлінісі жануарлардың асқазан-ішек микробиомасындағы архейлердің мөлшеріне байланысты. Зерттеу нәтижесінде бұқалардың рационына зығыр тұқымын енгізу салмақтың өсуіне және метан өндірісінің артуына ықпал ететіні анықталды. Сонымен, тәжірибелік топтың тірілей салмағының абсолютті өсуі $124,5 \pm 6,95$ кг, ал бақылау тобында $105,33 \pm 2,16$ кг. Зығыр тұқымын пайдалану анаэробты бактериялар мен архейлердің көбеюіне, яғни метан өндірісінің артуына әкелді. Тұқымдық деңгейде зығыр тұқымымен қоректенгенге дейін жануарлармен салыстырғанда 3-ші айда метаногендер санының статистикалық маңызды өзгеруі, эксперименттің басталуы, анықтамалық нүкте (T0) *Methanocorpusculaceae* (255 есе өсу), *Methanomethylophilaceae* (13 есе өсу) және *Methanobacteriaceae* (6 есе өсу) расталды.

Кілтті сөздер: микробиом, ірі қара мал, қазақтың ақ басы, зығыр тұқымдары, жаңа ұрпақ секвендеу.

IRSTI: 34.15.23, 68.39.29

S.T. DAUGALIYEVA^{1*}, A.T. DAUGALYIEVA², A.I. ASHANIN², B.B. YERGALI²

¹Research and production center of microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh Research Institute for livestock and Fodder Production, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

INFLUENCE OF THE DIET ON THE PRODUCTIVITY OF THE KAZAKH WHITE HEAD STEERS AND CONCENTRATION OF ARCHAEA IN THE GASTROINTESTINAL TRACT MICROBIOME

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.15

Abstract

The article provides information on the effect of a diet with the addition of flax seeds on the productivity of the steers of the Kazakh white-headed breed and their production of methane. The production of methane depends on the concentration of archaea in the microbiome of the gastrointestinal tract of animals. As a result of the research, it was found that the introduction of flax seeds into the diets of the steers contributes to weight gain and an increase in methane production. Thus, the absolute increase in live weight in the experimental group was 124.5 ± 6.95 kg, in the control group - 105.33 ± 2.16 kg. The use of flax seeds has led to an increase in the number of anaerobic bacteria and archaea, that is, to an increase in methane production. At the family level,

a statistically significant variation in the abundance of methanogens at 3 months compared to animals before flax seed feeding, beginning of the experiment, baseline (T0) was confirmed for *Methanocorpusculaceae* (255-fold increase), *Methanomethylophilaceae* (13-fold increase) and *Mathanobacteriaceae* (increase 6 times).

Keywords: microbiome, cattle, Kazakh white-headed, flax seeds, new generation sequencing.

More than half of the methane in the atmosphere are the result of the development of agriculture, primarily animal husbandry. Methane is produced as a side effect of the digestive processes of cattle. Methane emissions from animals into the environment contribute to climate change. Methane leads to the greenhouse effect: compared to carbon dioxide, it is able to retain more heat than carbon dioxide. Stomach gases, as a result of malnutrition and digestion of animals, are becoming a problem in countries with developed agriculture. By 2030, the ambient temperature is expected to increase from 1.5 to 2°C.

Kazakhstan is a country with a developed animal husbandry, in which the number of cattle is increasing every year, respectively, more methane is emitted. To reduce methane emissions, it is necessary to change the diet of cows [1]. Pretty D.C., Char S., Hongmin D. et al. [2] note that the ratio of concentrates and coarse feed in the diet affects the growth of the animal, fermentation in the rumen, methane emissions and animal health [2]. As a rule, when the proportion of coarse feed is higher, cellulose-destroying bacteria multiply and acetic acid fermentation with hydrogen production prevails in the rumen, which stimulates massive reproduction of archaea with an increase in methane emissions. However, when the proportion of concentrate in the diet is increased, the pH in the rumen decreases, which inhibits the growth of archaea and ciliates, while increasing the production of propionic acid. A number of authors have established that the composition of organic matter (carbohydrates) in the diet of animals affects the nature and rate of fermentation, as well as the formation of essential fatty acids (EFAs) and methane [3–5]. Starch diets stimulate propionate production and reduce methane production. Such diets affect the rumen pH and the formation of methane. Diets containing coarse feed have the opposite effect. Rations containing roughage have the opposite effect. The influence of diet composition on methane emission was also established by other scientists [6, 7]. BIn India, it was found [8] that Holstein cows eat high-quality diets and produce 6-7 times less methane per 1 liter of milk than local cows, which reduces methane emissions by 20-30% due to livestock. Another way to reduce methanogenesis in the rumen may be inhibited due to the formation of alternative products. Thus, acetogenic bacteria in the large intestine of mammals produce acetic acid during the reduction of CO₂ with the participation of H₂ formed during the fermentation of carbohydrates in the large intestine [9]. The enrichment of the animal diet with fats leads to a decrease in the infusoria in the rumen [10, 11] and a decrease in methane, and the source of fat affects the effectiveness of its action [12]. The inhibition of melanogenesis has been shown with the addition of fats (for example, flax seeds) to the diet [13]. When a probiotic from the fungus *Aspergillus oryzae* is added to the feed, the formation of methane in the rumen decreases by 50%, which is associated with a decrease in the number of infusorium in the rumen contents (by 45%) [14]. The addition of *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* to the incubation system leads to a 10% reduction in methane, while the addition *in vivo* does not affect it [15].

The decomposition of plant fiber occurs as a result of the hydrolysis of polysaccharides into monomers. The monomers are fermented by acidogenesis resulting in organic and short chain fatty acids. Hydrogen (H₂) and carbon dioxide (CO₂) are also produced. Methanogens remove H₂ by reducing CO₂ to form methane [16, 17]. Therefore, understanding the microbial composition of the gastrointestinal tract of ruminants is important to assess the extent of methane production. The development of a diet for cattle in order to reduce methane emissions and its negative impact on the environment is an urgent global environmental problem.

Materials and methods

Studies of the effect of adding flax seeds to the diet on the microbiota of the gastrointestinal tract (GIT) of cows were carried out in the farm "Kuldybaev Dauletgali", Karatal district, Zhetysu region, in the testing center for determining the chemical composition of feed and product quality of LLP "Kazakh Research Institute for livestock and Fodder Production" and in the laboratory molecular genetic research of LLP "SPC of Microbiology and Virology".

Kazakh white-headed steers aged 8-10 months served as the object of the study, with an average initial live weight of 180-210 kg and an average daily increase of 1100-1200 g. The fodder base was represented by mixed hay, corn silage, corn, wheat bran. Chemical analysis of feed was carried out according to State standart 32040-2021. To study the chemical composition of the feed, an Infrasound device from FOSS (Denmark) was used. The animals were kept in open areas, without a leash. Feeding was carried out twice a day. After studying the chemical composition of feed and the formation of experimental groups, taking into account the live weight and average daily gains of animals, rations for experimental groups were developed. When developing diets, the norms of feeding farm animals developed by the Institute of Animal Husbandry were used [18]. During the experiment, once a month, the productivity of animals and feed consumption were taken into account. The digital material was processed by the method of variation statistics [19]. In accordance with the standard values of the reliability criterion (according to Student), three levels of probability were used: 0.95; 0.99 and 0.999. At $P < 0.95$, the differences between the groups were considered insignificant. If the probability level of the above indicators, then the differences are considered reliable with an error of 0.05, 0.01 and 0.001%.

The study of the steers microbiome was carried out using 16S metagenomic analysis on the Illumina MiSeq sequencer using new generation sequencing technology (NGS). Fecal samples were taken rectally from the steers for analysis. Samples were collected from 3 steers before feeding with flax seeds (T0), and then in the first, second and third months after feeding. In addition, 3 animals that were not given flax seeds were included in the experiment as a control. The samples were delivered to the laboratory in a thermowell with refrigerating elements and stored at -20°C [20]. 250 mg of fecal samples were taken to isolate DNA. DNA was isolated with a PureLink™ microbiome DNA isolation kit (Invitrogen, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Genetic libraries for metagenomic 16S sequencing were prepared in accordance with the guidelines (No. 15044223 rev A). The finished libraries with PhiX were sequenced using the MiSeq® Reagent Kit v3 for 600 cycles (Illumina Inc., USA).

The 16S metabarcoding data of the samples was analyzed using Data QC workflows. The data was generated from the MiSeq run and consisted of demultiplexed fastq files that were imported into the CLC Genomics Workbench v software. 22. (Qiagen). Before clustering started, the reads were truncated and the low-coverage reads were removed from the analysis. Sequences of 16S primers for sequencing were provided in .clc. format. SILVA SSU v. 138. was used as a database in the analysis. (www.arb-silva.de/documentation/release-138).

In the CALC Microbial Genomics module, a phylogenetic tree of all OTU (phylogenetic diversity and UniFrac distances) was used to measure alpha and beta diversity. The phylogenetic tree was reconstructed using a maximum likelihood approach based on the alignment of OTU sequences (MSA) generated in the MUSCLE stand. In order to assess similarities between accessions, a differential abundance analysis was performed to find the operational taxonomic units (OTUs) that have the most disparate abundances in the samples. The validity of the results was assessed by the Permanova analysis, which can be used to measure the effect size and the significance of beta diversity.

Results and discussion

As a result of the study of feed, it was found that the feed in the «Kuldybayev Dauletgali» farm was of average quality. Thus, mixed hay in terms of the content of crude protein and crude ash should be attributed to the 1st class, in terms of the content of crude fiber - to the 2nd class. However, in terms of dry matter content, hay is not cool. Corn silage in accordance with State

standart 55986-2014 is classified to the 1st class in terms of dry matter, crude protein and crude fiber, and to the 3rd class in terms of the concentration of crude ash in the dry matter of the feed. To carry out the scientific and economic experiment, two experimental groups of steers with 10 heads each were formed according to the principle of pairs of analogues [21] (Table 1).

Table 1 – Scheme of scientific and economic experience on steers

Group	Number of steers	Feeding conditions
Control group	10	Basic diet (BR)
An experienced group	10	Basic diet + flax grain

The difference in the diets of the experimental groups of animals was that the experimental group received flax seeds in the diet. At the same time, coarse feed in the structure of the diet of the control group occupied 22.0%. Juicy feeds accounted for 20.0%. The share of concentrated feed was 58.0%. There was a similar structure of rations in the experimental group. Thus, the share of roughage accounted for 22.5%, the share of succulent - 19.5%. The proportion of concentrates in the diet was 58.0%. Including flax seeds accounted for 9.2%. Hay consumption in the control group was 86.3%, silage - 96.47%, concentrates were eaten completely. In the experimental group, the feedability of hay was 86.43%, corn silage - 96.5%, concentrates were eaten completely. It follows from the data that the feed intake was the same in both groups. On average, animals of both groups consumed the same amount of dry matter (7.53 kg) per day. At the same time, energy consumption was higher in the experimental group by 5.13%, crude protein - by 2.0%, digestible protein - by 3.14%, and crude fat - by 56.6%, which is associated with the introduction of flax seeds into the diet in the amount of 500 g per head per day. The introduction of flax seeds in the diet of the experimental group had a positive effect on the productivity of animals. Thus, the absolute increase in weight in the experimental group was 124.5 ± 6.95 kg, and in the control group – 105.33 ± 2.16 kg. The excess was 19.17 kg or 18.2 relative percent ($P > 0.95$). The average daily increase in weight in the experimental group was higher and amounted to 1270.40 ± 70.94 g versus 1074.8 ± 22.01 g. The excess was 195.6 g or 18.2 relative percent ($P > 0.95$). This difference is due to the fact that the diets of the experimental group contained more energy, crude and digestible protein and fat. An increase in the average daily weight gain of the experimental group of steers had a positive effect on feed costs per 1 kg of weight gain. So, in the control group they amounted to 7.26 EFU (energy feed units), and in the experimental group – 6.45 EFU or less by 0.81 EFU, which was 12.6%. Along with this, the content of anaerobic bacteria and archaea in the feces of experimental animals was studied. The research results are presented in table 2.

Table 2 – The content of anaerobic bacteria and archaea in the faeces of experimental animals, %

Anaerobic bacteria	Group of steers		Probability level
	Control group	An experienced group	
Bacteria	98.67 ± 0.18	99.52 ± 0.03	$P > 0.95$
Archea	0.02 ± 0.01	0.2 ± 0.01	$P > 0.999$

From the data in Table 2 it follows that the highest concentration of Archea is found in the experimental group ($0.2 \pm 0.01\%$) compared to the control group of steers (0.02 ± 0.01). The increase is 0.18 absolute percent or 10.0 times ($P > 0.999$). The analysis of the data obtained showed that the introduction of flax seeds into the diets of steers contributes to an increase in the number of anaerobic bacteria while increasing the concentration of archaea.

As a result of bioinformatic processing, generated OTU clusters were obtained, which are shown in Figure 1.

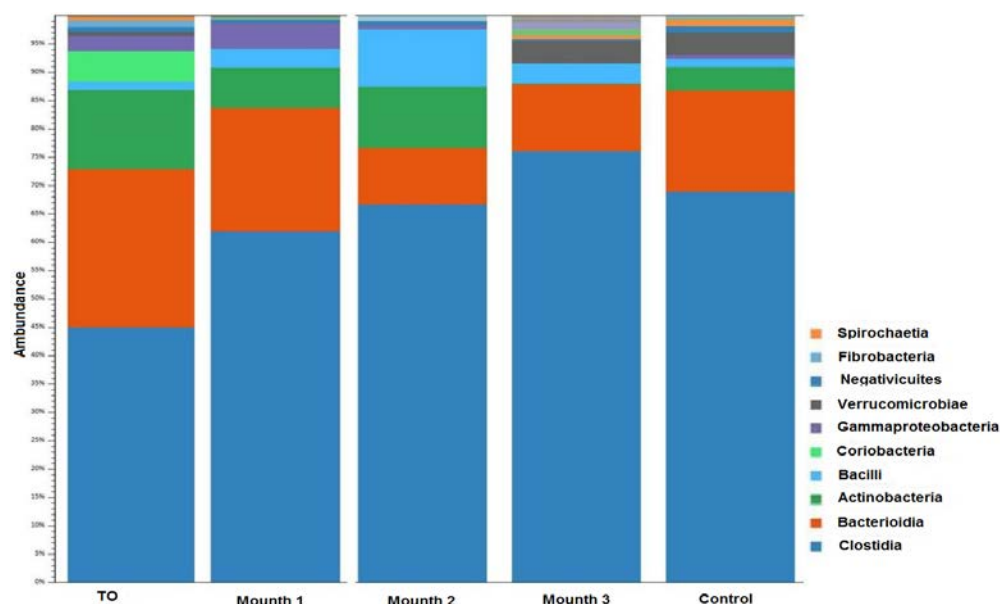


Figure 1 – Microbiota of steers at the class level in samples grouped by feeding flax seeds

Figure 1 shows an increase in the number of *Clostridia* from T0 to the 3rd month of feeding with flax seeds. Moreover, the number of *Bacteroides* decreases. These results were further evaluated by conducting a statistical analysis of the samples.

Alpha diversity was plotted on the diagram by grouping samples of flax seed introduction (Figure 2).

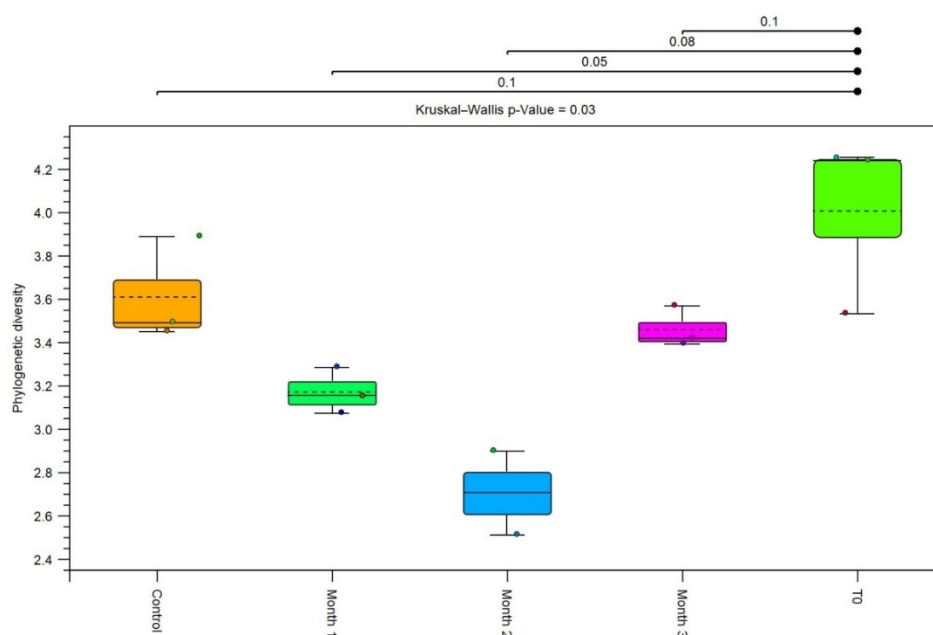


Figure 2 - Alpha diversity – rectangular diagram when feeding flax

The figure shows a significant separation of feeding groups ($p = 0.03$).

Beta diversity analysis shows the analysis of basic coordinates (PCoA) at UniFrac distances (Figure 3).

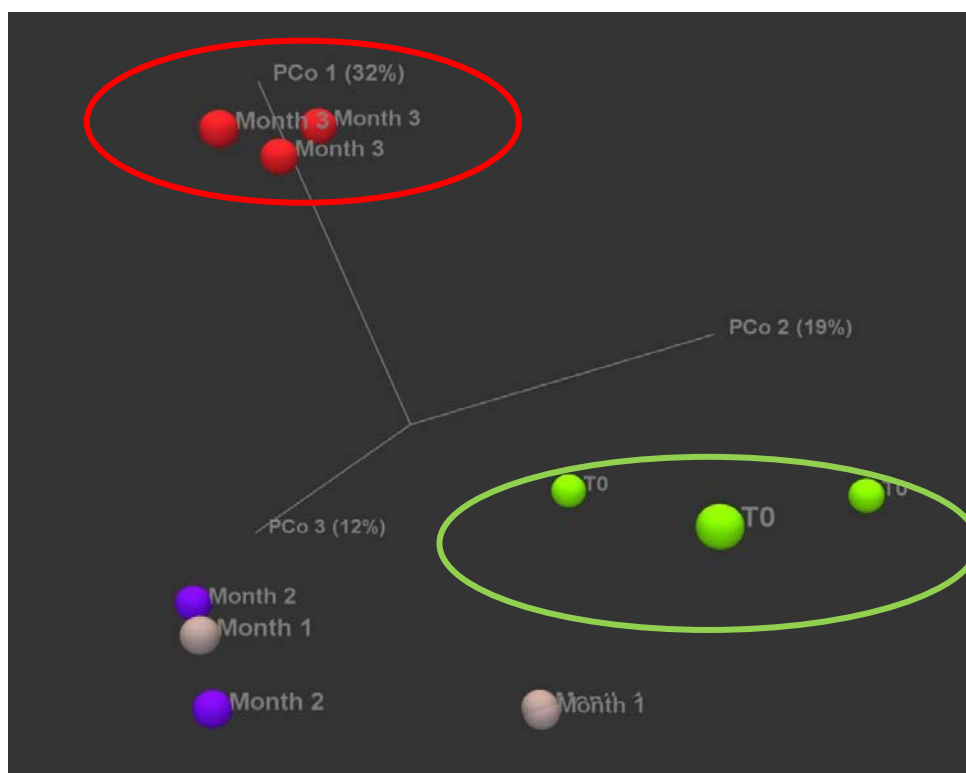


Figure 3 - Result of Beta diversity analysis — PCoA

In PCoA, the spheres of beta diversity in the graph are colored according to the metadata (feeding a flax seed diet). Interestingly, in this analysis, the microbiota at T0 and after 3 months flax seed feeding is clearly clustered into two different clusters. Animals over 1 and 2 months are also separated from the first groups, but tend to mix with each other. PCoA, involves a gradual change in the composition of the microbiota after feeding with flax.

Table 3 - Result of permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) analysis (Bry Curtis)

Groups			Pseudostatistics	p-value
			2.50489	0.00246
1	2	3	4	5
Group 1	Group 2	Pseudostatistics	p-value	P-value (Bonferroni)
Before	Month 2	0,78822	0,90000	1,00000
Before	Month 2	1,62391	0,10000	1,00000
Month 2	Month 3	2,18331	0,10000	1,00000
Before	Control	2,06822	0,10000	1,00000
Month 2	Control	4,79052	0,10000	1,00000
Month 3,	Control	11,24487	0,10000	1,00000
Before	Month1	1,03102	0,50000	1,00000
Month 2	Month1	0,78543	0,60000	1,00000
Month 3,	Month1	5,38830	0,10000	1,00000
Control	Month1	5,03025	0,10000	1,00000
PERMINOVA analysis (Jacquard)				
Variable	Groups		Pseudostatistics	p-value
Feeding	Before, Month 2, Month 3, Control, Month1		2,17219	0,00051

Table 3 continuation

1	2	3	4	5
Group 1	Group 2	Pseudostatistics	p-value	P-value (Bonferroni)
Before	Month 2	0,92241	0,80000	1,00000
Before	Month 2	1,98391	0,10000	1,00000
Month 2	Month 3	1,97859	0,10000	1,00000
Before	Control	1,69119	0,10000	1,00000
Month 2	Control	2,97312	0,10000	1,00000
Month 3	Control	6,45427	0,10000	1,00000
Before	Month 1	1,18759	0,20000	1,00000
Month 2	Month 1	0,85116	0,60000	1,00000
Month 3	Month 1	3,95923	0,10000	1,00000
Control	Month 1	3,20675	0,10000	1,00000

Methanogens. Bioinformatics analysis was carried out at 3 taxonomic levels: class, family and genus.

To check for a difference between the two groups, a differential analysis of the number of archaea was carried out (Table 4). The result of this analysis showed a 6-fold and 285-fold increase in the abundance of archaea of the classes *Methanobacteria* and *MethonOMICROBIA*, respectively, after the introduction of flax seeds into the diet for 3 months. These values are statistically confirmed, since the p - values are significantly lower than the threshold value ($p < 0.05$).

Table 4 - OTU Differential Population analysis at class level

Class name	Changing the fold	p-value
<i>Methanobacteria</i>	5,91	7,95E-3
<i>MethonOMICROBIA</i>	258,21	1,54E-3

The same approach was applied at the family and genus level (Figure 4), which confirms the increase in methanogens at 3 months compared to animals before feeding with flax seeds (T0). In particular, the methanogenic component of the microbiota of the gastrointestinal tract of cattle was identified as the families *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylophilaceae* and the genera *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*.

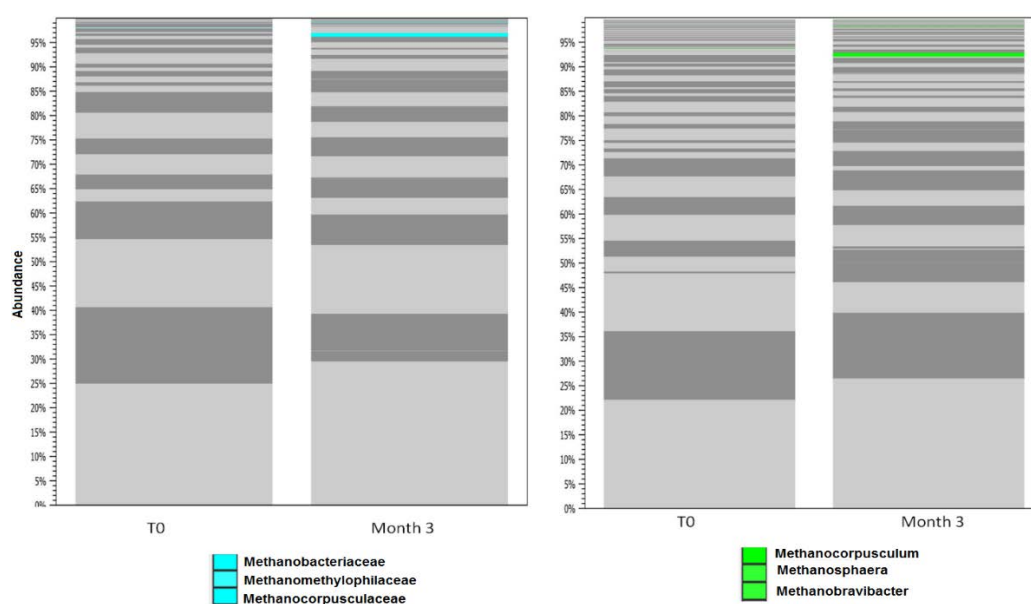


Figure 4 - Microbiota of steers at the family and genus levels of archaea in samples grouped by feeding on flax seeds. The methanogen component is colored in light blue and green colors

Similarly, differential abundance analysis was performed for families and genera of methanogens (Tables 5, 6). At the family level, a statistically significant variation in abundance at 3 months compared to animals before flax seed feeding (T0) was confirmed for *Methanocorpusculaceae* (255-fold increase) and *Mathanobacteriaceae* (6-fold increase). The results also showed a 13-fold increase in *Methanomethylophilaceae*.

Table 5 - OTU Differential abundance analysis at archaeal family level

Name	Changing the fold	p-value
<i>Methanocorpusculaceae</i>	254,81	1,36E-3
<i>Methanobacteriaceae</i>	6,05	0,02
<i>Methanomethylophilaceae</i>	12,72	0,07

Table 6 -OTU Differential abundance analysis at the level of archaea genera

Name	Changing the fold	p-value
<i>Methanocorpusculum</i>	166,92	0,08
<i>Methanosphaera</i>	-1,51	0,52
<i>Methanobrevibacter</i>	1,00	0,98

A heat map (Figure 5) including all experimental groups (control, before flax seed feeding (T0), month 1, 2, 3) was created based on the table of operational taxonomic units (OTU) to keep all taxonomic information in the analysis.

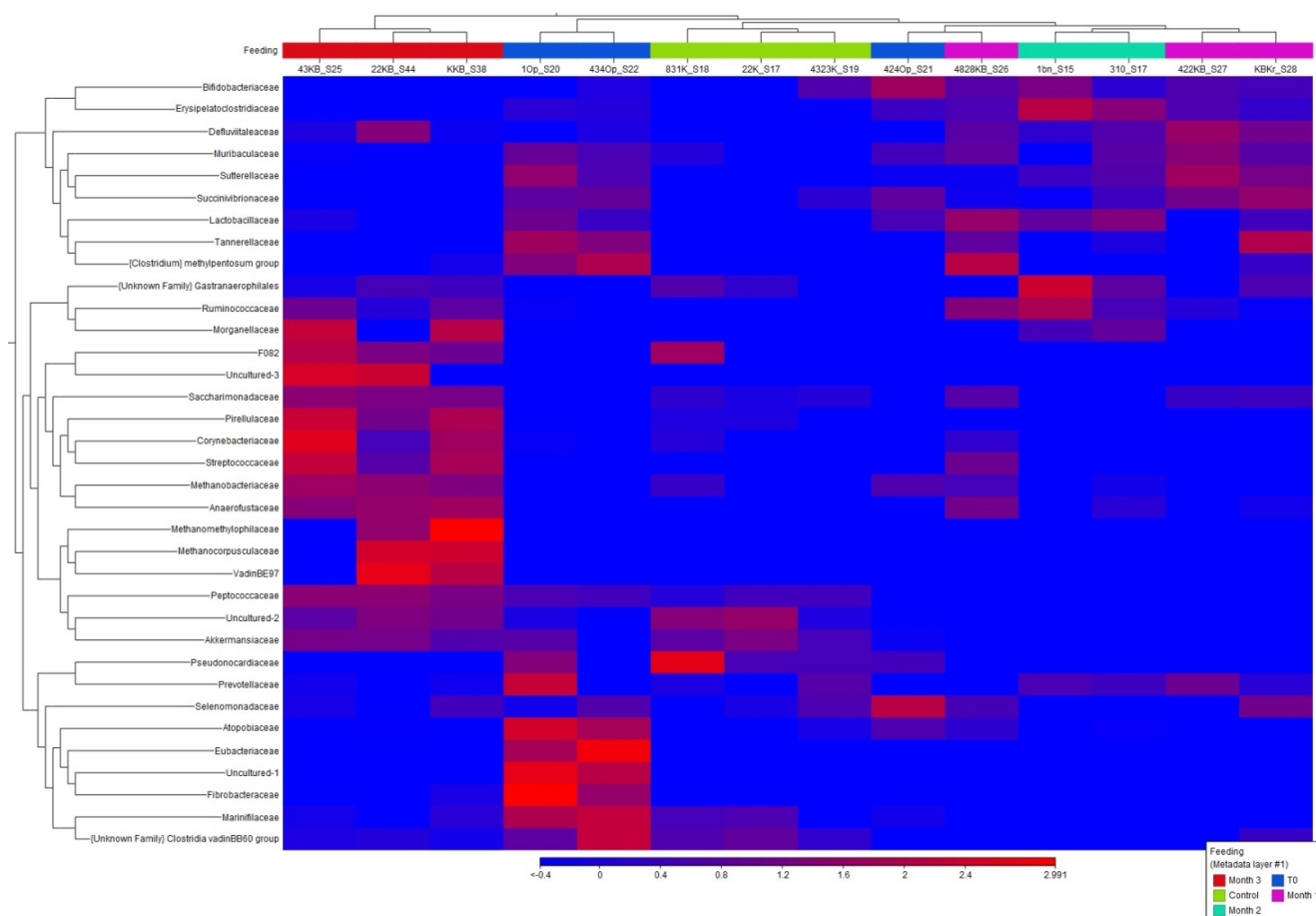


Figure 5 - Heat map of the OTU table for methanogens

This analysis is also very informative, as it shows that the increase in methanogens is insignificant up to 2 months after feeding with flax seeds, while the methanogenic component begins to increase as early as the third month.

Conclusion

In the experimental group of steers fed with flax seeds, there was a greater increase in weight compared to the control group. As a result of the metagenomic analysis, it was revealed that the introduction of flax seeds into the diets of steers contributes to an increase in the number of anaerobic bacteria and archaea (families *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylophilaceae* and the genera *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*), which contributes to an increase in the productivity of steers and methane emission.

Funding

The work was supported financially by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant no. AP09259133).

References:

- 1 Korovy kak istochnik parnikovogo jeffekta? 2016. URL: <https://ru.euronews.com/methane-gas-threatening-to-slow-efforts-to-slow-climate-change>.
- 2 Upreti, DC, Subash Dhar, Dong Hongmin, Bruce A., Kimball, Amit Garg, Jigisha Upadhyay. *Technologies to mitigate the effects of climate change*. New Delhi. 2012. 141 P.
- 3 Luchka I.V., Bogdanov, G.O., Sologub L.I., Fedjakov R.O., Gerasimiv M.G. Vpliv vuglevodiv ta ih metabolitiv na metanoutvorennya i produkciju letkih zhirnih kislot mikroorganizmami rubcja teljat. V sb.: *NTB Institutu biol. nauk UAAN*, K., 2004: 53-56.
- 4 Luchka I.V., Bogdanov G.O., Sologub L.I., Janovich V.G., Gerasimiv M.G. Utvorennya metanu v rubci velikogo rogatogo hudobi Zahidnoj Ukraini za rznogo tipu godivli. V sb.: *NTB Institutu biol. nauk UAAN*, K., 2005, 6:77-80.
- 5 Melikjan S.M., Luchka, I.V., Sologub L.I. Do renuljacija redukcij nitrativ i utvorennya metanu u rubci teljat. V sb.: *NTB Institutu biol. nauk UAAN*, 2006, 7:188-192.
- 6 Moss A.R. Methane production by ruminants — literature review: I. Dietary manipulation to reduce methane production. *Laboratory procedures for estimating methane potential of diets Nutrition Abstracts and Reviews*, 1994, 64:786-806.
- 7 Lana R.P., Russell J.B., Van Amburgh M.E. The role of pH in regulating methane and ammonia production. *Animal Science*, 1998, 76:2190-2196 (doi: 10.2527/1998.7682190x).
- 8 Fahey G.C., Berger L.L. Carbohydrate nutrition in ruminants. In: *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition*. D.C. Church (ed.). V sb.: *Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey*, 1988: 269-297.
- 9 Demeyer D.I., De Graeve K. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1991, 22: 50-61.
- 10 Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. The effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54:544-547 (doi.org/10.1128/aem.54.2.544-547.1988).
- 11 Czerkawski J.W., Christie W.W., Breckenridge G., Hunter, M.L. Changes in rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *British Journal of Nutrition*, 1995, 34: 25-44 (doi: 10.1017/s0007114575000074).
- 12 Machmuller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuzer M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 1998, 77:117-130 (doi: 10.1016/S0377-8401(97)00126-0).
- 13 Dohme F., Machmuller A., Estermann B.L., Wasserfalle, A., Kreuzer, M. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 2: 187-193 (doi: 10.3389/fmicb.2015.01313).
- 14 Frumholtz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *The Journal of Agricultural Science (Camb.)*, 1989, 113:169-172.

15 Mathieu F., Jouany J.P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, 1996, 36: 271-287 (doi: 10.1051/rnd:19960305).

16 Ishler, V., Heinrichs J., Varga G. *From feed to milk: understanding rumen function*. The Pennsylvania State University, 1996.

17 Morgavi D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold C.J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 2021, 6 (5): 871 (doi: 10.1017/S1751731110000546).

18 Kalashnikov A.P., Fisinin V.I., Shheglov V.V. *Normy i rationy kormleniya s.-h. zhivotnyh*. M., 2003. 305 P.

19 Jakovenko A.M., Antonenko T.I., Selionova M.I. *Biometricheskie metody analiza kachestvennyh i kolichestvennyh priznakov v zootehnii*. M., 2013. 91 P.

20 Shoukun J., Hongtao Zh., Hui Y., Arash A., Haitao Shi., Gibson A., Shengl L., Zhijun C., and Yajing W. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta rumen liquid and solid fractions in lactating in Holstein cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8:16 (doi: 10.1186/s40104-017-0142-z).

21 Ovsjanikov A.I. *Osnovy opytnogo dela v zhivotnovodstve*. M., 1976. 304 P.