

УДК 665.345.4:636.085.25

DOI: 10.33284/2658-3135-104-2-84

**Влияние дополнительного введения льняного масла на изменение микробиома рубца крупного рогатого скота**

**Е.В. Шейда<sup>1,2</sup>, С.В. Лебедев<sup>2</sup>, С.А. Мирошников<sup>2,1</sup>, Г.К. Дускаев<sup>2</sup>, В.А. Рязанов<sup>2</sup>, В.В. Гречкина<sup>2,3</sup>, Ш.Г. Рахматуллин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Оренбургский государственный университет (г. Оренбург)

<sup>2</sup>Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (г. Оренбург)

<sup>3</sup>Оренбургский государственный аграрный университет (г. Оренбург)

**Аннотация.** Качественное кормление – залог получения сельскохозяйственной продукции высокого класса. С целью оптимизации кормления и коррекции нутриентного состава рационов проводятся многочисленные исследования, направленные на изучение таксономического состава рубца. Количественный и качественный составы микробиома рубца не могут напрямую повысить усвояемость кормов и выход готовой продукции, но они дадут знания, которые помогут разработать новые рациональные диетические вмешательства для повышения эффективности кормления и увеличения продуктивности. Целью исследования явилось изучение степени переваримости сухого вещества (СВ) рациона и влияние на состав микрофлоры рубца путём дополнительного введения льняного масла (3 % от СВ рациона) *in vitro* с использованием модели «искусственного рубца» на установке-инкубаторе «ANKOM Daisy II» (модификации D200 и D200I). Изучение микробиома рубца проводили на модели бычков с фистулой рубца (n=3). Анализ микрофлоры – с помощью MiSeq («Illumina», США) методом секвенирования нового поколения (NGS). При введении льняного масла отмечено повышение переваримости СВ корма на 2,3 %. Дополнительное включение льняного масла в рацион крупного рогатого скота способствовало увеличению видового разнообразия микробиоты рубца, численности бактерий филума *Bacteroidetes* (64,2 %), а также достоверному повышению представителей домена археи, участвующих в метаногенезе рубца. Установлено, что при введении льняного масла уровень видового разнообразия был выше, чем в контроле на 45 %. Индекс доминирования Симсона в контрольной группе составил 0,44, в опытной группе – 0,54. Наиболее выраженное изменение уровня разнообразия было отмечено в опытной группе, индекс Шеннона (P≤0,05) составил 0,76. Индексы β-разнообразия Жаккара и Серенсена свидетельствуют о полном совпадении сообществ в контрольной и опытной группах.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, кормление, льняное масло, микробиом, рубец, переваримость.

UDC 665.345.4:636.085.25

**Effect of supplemental flaxseed oil on altering of rumen microbiome of cattle**

**Elena V Sheyda<sup>1,2</sup>, Svyatoslav V Lebedev<sup>2</sup>, Sergey A Miroshnikov<sup>2,1</sup>, Galimzhan K Duskaev<sup>2</sup>, Vitaly A Ryazanov<sup>2</sup>, Victoria V Grechkina<sup>2,3</sup>, Shamil G Rakhmatullin<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Orenburg State University (Orenburg, Russia)

<sup>2</sup>Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)

<sup>3</sup>Orenburg State Agrarian University (Orenburg, Russia)

**Summary.** High-quality feeding is the key to obtaining high-class agricultural products. In order to optimize feeding and correct the nutrient composition of diets, numerous studies aimed at studying the taxonomic composition of the rumen are done. The quantitative and qualitative compositions of rumen microbiome cannot directly increase feed digestibility and yield of finished products, but they will provide knowledge that will help to develop new rational dietary interventions to improve feeding efficiency and

increase productivity. The aim of the study was to study the degree of digestibility of the dry matter (DM) of the diet and the effect on the composition of the rumen microflora by additional administration of flaxseed oil (3 % of the DM of the diet) in vitro using the "artificial rumen" model on the "ANKOM Daisy II" incubator (modifications D200 and D200I). The study of rumen microbiome was carried out on a model of bulls with a rumen fistula (n=3). Microflora analysis was performed using MiSeq ("Illumina", USA) by the new generation sequencing (NGS) method. With the introduction of flaxseed oil, an increase in the digestibility of SV feed by 2.3% was noted. The additional inclusion of flaxseed oil in the diet of cattle contributed to an increase in the species diversity of the rumen microbiota, the number of bacteria of Bacteroidetes (64.2%), as well as a significant increase in representatives of the archaea domain involved in rumen methanogenesis. It was found that the level of species diversity was 45% higher with the introduction of flaxseed oil than in the control. The Simpson index in the control group was 0.44, in the experimental group – 0.54. The most pronounced change in the level of diversity was observed in the experimental group, the Shannon index ( $P \leq 0.05$ ) was 0.76. The indices of  $\beta$ -diversity of Jaccard and Sørensen indicate a complete coincidence of the communities in the control and experimental groups.

**Keywords:** cattle, feeding, flaxseed oil, microbiome, rumen, digestibility.

#### Введение.

Млекопитающие могут синтезировать все жирные кислоты (ЖК), необходимые для нормального течения обменных процессов, за исключением полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые должны поступать с рационом. ПНЖК, входящие в состав льняного масла, участвуют во многих химических реакциях в организме, поэтому добавка их в рацион представляет особый интерес в кормлении крупного рогатого скота с обогащением этих пищевых продуктов ЖК (Moallem U, 2018).

Включение в рацион на основе ячменного силоса льняного масла (60 г/кг сухого вещества) способствовало большему ( $P \leq 0,01$ ) накоплению полезных промежуточных продуктов биогидрирования (C18:2 транс-11, цис-15; C18:1 цис-15), что отражает способность льняного масла производить более желательные ЖК (Ding S et al., 2016; Kronberg SL et al., 2012).

Использование такой муки из семян льна в количестве до 15 % в рационах животных не вызывает отрицательного влияния на организм и способствует повышению продуктивности (Gushchin VV et al., 2016), благодаря значительному содержанию в ней протеина и жира, благодаря чему можно регулировать питательную ценность корма (Chung MWY et al., 2005).

Установлено, что отвар из льняного жмыха и семени легко усваивается организмом животного, обволакивает стенки кишечника, препятствует всасыванию вредных веществ, выделяемых кишечными микробами, способствует удалению их из организма. Льняные белки характеризуются высокой биологической ценностью. Сравнение аминокислотного состава льняных белков с составом «идеального» белка показывает, что содержание изолейцина, фенилаланина (с тирозином) и триптофана в льняном семени превышает таковое в «идеальном» белке и составляет соответственно 106, 115,8 и 180 %. Содержание валина (97 %) и треонина (92,5 %) приближается к эталонному показателю. Лимитирующей аминокислотой, которая характеризует биологическую ценность льняных белков, является лизин (72,7 %) (Зубцов В.А. и Миневи́ч И.Э., 2015).

Рубец, по-видимому, является основным местом превращения секоизоларицирезинола диглюкозида в энтеролигнаны, энтеродиол и энтеролактон. Однако имеется ограниченная информация о видах микробиоты рубца, участвующих в метаболизме диглюкозида секоизоларицирезинола (Brito AF and Zang Y, 2019).

Микрокапсулы масла могут не только улучшать структуру кишечника, но также увеличивать число бактерий *Paenibacillus* и уменьшать количество вредных бактерий *Pseudoalteromonas*, а также *Roseovarius* в кишечнике. Липиды из льняного семени (и жиры вообще), добавляемые в рацион, заменяют часть пищевых углеводов и, поскольку рубцовые микробы не ферментируют их, вырабатывается меньше водорода. Установлено, что при добавлении льняного масла число простейших уменьшается (Guyader J et al., 2015; Martin C et al., 2016), хотя этот эффект наблюдался не всегда (Benchaar C et al., 2012).

**Цель исследования.**

Изучение степени переваримости сухого вещества (СВ) рациона и влияние на состав микробиома рубца дополнительного введения льняного масла.

**Материалы и методы исследования.**

**Объект исследования.** Рубцовое содержимое, бычки казахской белоголовой породы, средней массой 220-225 кг, в возрасте 8 месяцев.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями российских нормативных актов (1987 г.; Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Academy Press, Washington, D.C., 1996). При проведении исследований были предприняты меры, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества исследуемых опытных образцов.

**Схема эксперимента.** Изучение микробиома рубца производили на модели бычков с фистулой рубца (n=3) методом латинского квадрата.

В исследованиях использовали нерафинированное льняное масло (ООО «Планета вкуса», ООО «Бизнесойл», Россия) – СТО 40490379-001-2015, ТР ТС 024/2011 Технический регламент на масложировую продукцию (табл. 1). Исследуемое масло добавляли в количестве 3 % от сухого вещества рациона путём замешивания в корм (в качестве субстрата использовали пшеничные отруби – контроль).

Таблица 1. **Жирнокислотный состав льняного масла, %**  
Table 1. **Fatty acid composition of flaxseed oil, %**

Условное обозначение жирной кислоты/ <i>The symbol of the fatty acid</i>	Наименование жирной кислоты/ <i>Name of the fatty acid</i>	Содержание, %/ <i>Content, %</i>
C <sub>16:0</sub>	Пальмитиновая/ <i>Palmitic acid</i>	6,2
C <sub>18:0</sub>	Стеариновая / <i>Stearic acid</i>	4,4
C <sub>18:1</sub>	Олеиновая/ <i>Oleic acid</i>	16,9
C <sub>18:2</sub>	Линолевая/ <i>Linoleic acid</i>	16,6
C <sub>18:3</sub>	Линоленовая/ <i>Linolenic acid</i>	55,5
C <sub>22:2</sub>	Арахидовая/ <i>Arachnoid</i>	0,4

Содержание насыщенных жирных кислот в этом масле составило 11 %, олеиновой кислоты – 16,9 %, линолевой – 16,6 %, линоленовой – 55,5 %.

Исследования переваримости СВ и микробиома рубца производили методом *in vitro* по специализированной методике. В качестве дисперсионной среды была выбрана дистиллированная вода.

У фистульных животных через 3 часа после кормления брали пробы рубцового содержимого, которые фильтровали через 4 слоя марли и вносили в камеру инкубатора «АНКОМ Daisy II», предварительно в камеру помещали образцы с исследуемыми кормами (мешочки), после чего замещали воздух углекислотной средой и выдерживали при температуре +39 °С в течение 48 часов. По окончании инкубации образцы промывались и высушивались при температуре +60 °С до константного веса.

Коэффициент переваримости сухого вещества *in vitro* вычисляли как разницу масс образца корма с мешочком до и после инкубации по следующей формуле:

$$K=(A-B)/C \times 100 \%,$$

где: К – коэффициент переваримости сухого вещества корма (%);

- А – исходная масса 1 (образец корма с мешочком) (мг);  
В – масса после инкубации (образец корма с мешочком) (мг);  
С – исходная масса 2 (образец корма без массы мешочка) (мг).

После инкубирования производили отбор рубцовой жидкости шприцом дозатором «Экохим ОПА-02-20» (ООО «Экросхим», Россия), в микропробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл. Для анализа отбирали 1,5 мл субстрата рубцовой жидкости, по одной пробе для каждого образца.

**Метагеномный анализ содержимого рубца.** Микробное биоразнообразие содержимого рубца проводили с помощью MiSeq («Illumina», США) методом секвенирования нового поколения (NGS) с набором реагентов MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН). При выделении ДНК отобранную пробу содержимого инкубировали при +37 °С в течение 30 мин в 300 мкл стерильного буфера для лизиса (20 мМ EDTA, 1400 мМ NaCl, 100 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 50 мкл раствора лизоцима в концентрации 100 мг/мл). К смеси добавляли 10 мкл протеиназы К («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США) в концентрации 10 мг/мл и SDS до конечной концентрации 1,0 % и инкубировали в течение 30 мин при +60 °С. ДНК очищали смесью фенола и хлороформа (1:1), осаждали добавлением ацетата натрия (3 М, до 10 % по объёму) и трёх объёмов абсолютного этанола при +20 °С в течение 4 ч. После экстракции смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1) и хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) ДНК в водной фазе осаждали 1 М ацетатом аммония (до 10 % по объёму) и 3-кратным объёмом безводного этанола в течение 12 часов при +20 °С. Осадок ДНК отделяли центрифугированием (12000 об./мин, 10 мин), дважды промывали 80 % этанолом, сушили и растворяли в ТЕ-буфере (1 М Tris-HCl, pH 8,0 – 1 мл, 0,5 М EDTA, pH 8,0 – 200 мкл, H<sub>2</sub>O – до 100 мл; «Евроген», Россия). Чистоту экстракции оценивали по отрицательному контролю выделения (100 мкл автоклавированной деионизированной воды). Чистоту полученных препаратов ДНК проверяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с фотометрией (NanoDrop 8000, «Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Концентрацию ДНК измеряли флуориметрическим методом (прибор Qubit 2.0 с высокой чувствительностью определения dsDNA, «Life Technologies», США).

ДНК-библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу «Illumina, Inc.» (США) с праймерами S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 к варибельному участку V3-V4 гена 16S рРНК. NGS-секвенирование выполняли на платформе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором реактивов MiSeq Reagent Kit V3 PE600 («Illumina, Inc.», США). Классификацию полученных операционных таксономических единиц (ОТЕ) проводили с использованием интерактивного инструмента VAMPS (<http://vamps.mbl.edu>) и базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Некоторые ОТЕ выравнивали с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), используя базы данных нуклеотидных последовательностей nr/nt ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) и выровненных последовательностей генов рибосомальной РНК SILVA (<https://www.arb-silva.de>).

Для биоинформатической обработки результатов используется программа PEAR (Pair-End AssembleR, PEAR v 0.9.8) (Zhang J et al., 2014).

Результаты секвенирования обрабатывали с использованием пакета анализа данных офисного программного комплекса «Microsoft Office» с применением программы «Excel» («Microsoft», США).

**Оборудование и технические средства.** Лабораторные исследования проводили в Центре коллективного пользования ФНЦ БСТ РАН (аттестат аккредитации № RA.RU.21ПФ59 от 02.12.15).

Исследования переваримости СВ и микробиома рубца производили методом *in vitro* с использованием модели «искусственного рубца» с использованием установки – инкубатора «ANKOM Daisy II» (модификации D200 и D200I). Термостат ТС-1/80 СПУ (ООО «Амедис Инжиниринг», г. Нижний Новгород, Россия), шприц-дозатор Экохим ОПА-2-20 (ООО «Экросхим», г. Санкт-Петербург, Россия), микропробирки «Eppendorf».

**Статистическая обработка.** Численные данные были обработаны с помощью программы SPSS «Statistics 20» («IBM», США), рассчитывали средние (M), среднеквадратичные отклонения ( $\pm\sigma$ ), ошибки стандартного отклонения ( $\pm SE$ ). Для сравнения вариантов использовали

непараметрический метод анализа. Различия считали статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ . Рассчитывали также индексы биоразнообразия Шеннона ( $H'$ ), Симпсона ( $D$ ), индекс выравненности Пиелу, индексы  $\beta$ -разнообразия Жаккара и Серенсена (Елина Е.Е., 2016).

#### Результаты исследования.

При введении льняного масла отмечено повышение переваримости СВ корма на 2,3 % ( $P \leq 0,05$ ) относительно контроля (пшеничные отруби) (рис. 1).

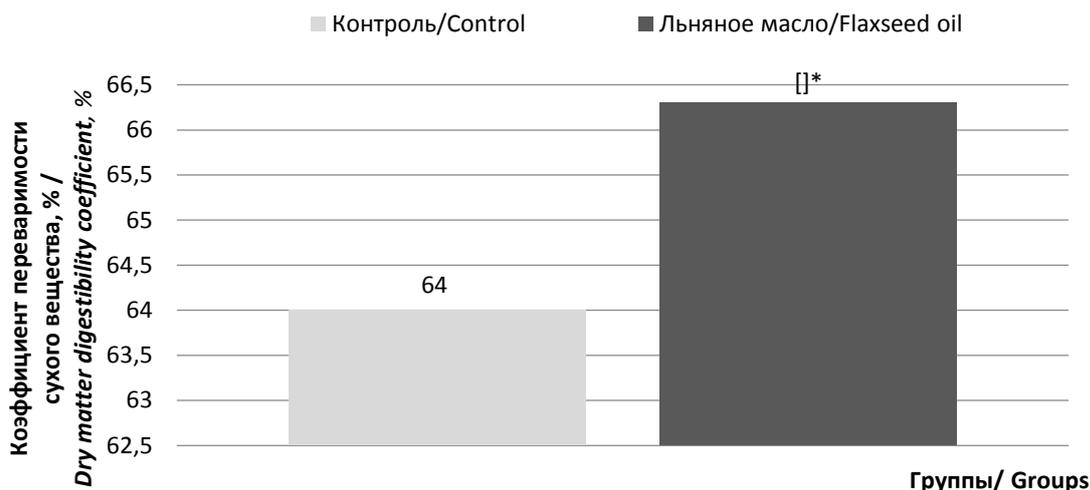


Рис. 1 – Коэффициент переваримости СВ корма при введении льняного масла, %  
Figure 1 – Digestibility of DM feed with the introduction of flaxseed oil, %

По результатам проведённого метагеномного секвенирования содержимого рубца телят представлены значения параметров  $\alpha$ -биоразнообразия. При сравнении групп по индексам Шеннона ( $H'$ ) и доминирования Симпсона ( $D$ ) оказалось, что их значения изменялись при дополнительном включении льняного масла в рацион. Так, установлено, что в опытной группе уровень видового разнообразия был выше, чем в контроле на 45 %. Индекс доминирования Симпсона в контрольной группе составил 0,44, в опытной группе – 0,54. На основе индекса Шеннона нами был вычислен показатель выравненности Пиелу ( $E$ ), данный индекс в контроле был равен 0,2, а в опытной группе –  $E=0,3$ , что показывает большую выравненность микробного сообщества в рубцовой жидкости при включении льняного масла. В нашем исследовании индекс Шеннона ( $P \leq 0,05$ ) увеличивался по сравнению с контрольной группой и составил 0,76.

Увеличение  $\alpha$ -разнообразия рубцового микробиома в опытной группе не оказывало влияние на  $\beta$ -разнообразие, так, были просчитаны индексы Жаккара и Серенсена, они оказались равны 1, что свидетельствует о полном совпадении сообществ в контрольной и опытной группах.

С целью оценить, были ли связаны вариации в  $\alpha$ -биоразнообразии с изменениями видового состава микробиоты рубцового содержимого, проведена оценка изменений в таксономии микробиоты рубца на основе данных NGS-секвенирования.

Метагеномное секвенирование содержимого рубца крупного рогатого скота контрольной группы показало наличие 12 филумов, из них 2 филума – доминирующих, в частности филум *Firmicutes* – 54,6 % и *Bacteroidetes* – 39,2 %. Эти две таксономические группы можно рассматривать как «ядро бактериального микробиома», поскольку они присутствуют в значительном количестве во всех исследуемых пробах. Доминирующие бактерии, обнаруженные в контрольном образце, предположительно ответственны за трансформацию основных компонентов рациона – целлюлозу, гемицеллюлозу, крахмал, органические кислоты, белки (рис. 2).

При введении в рацион высокоэнергетического компонента (льняного масла) на фоне возрастания продукции ЛЖК в рубце, наблюдается увеличение численности кислотоустойчивых бактерий филума *Bacteroidetes* (64,2 %) и снижение численности *Firmicutes* (19,3 %) (рис. 2).

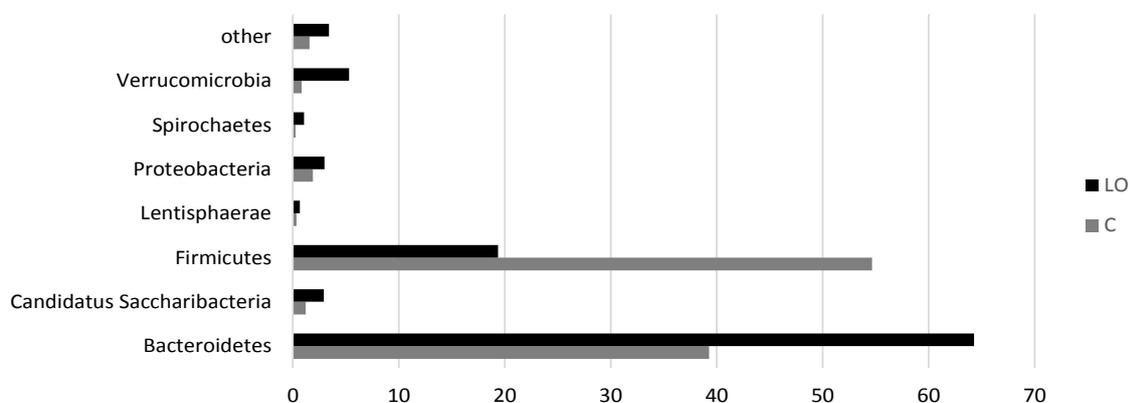


Рис. 2 – Таксономический состав микробиома рубцовой жидкости *in vitro* на уровне филума, %  
 Figure 2 – Taxonomic composition of the rumen fluid microbiome *in vitro* at the phylum level, %

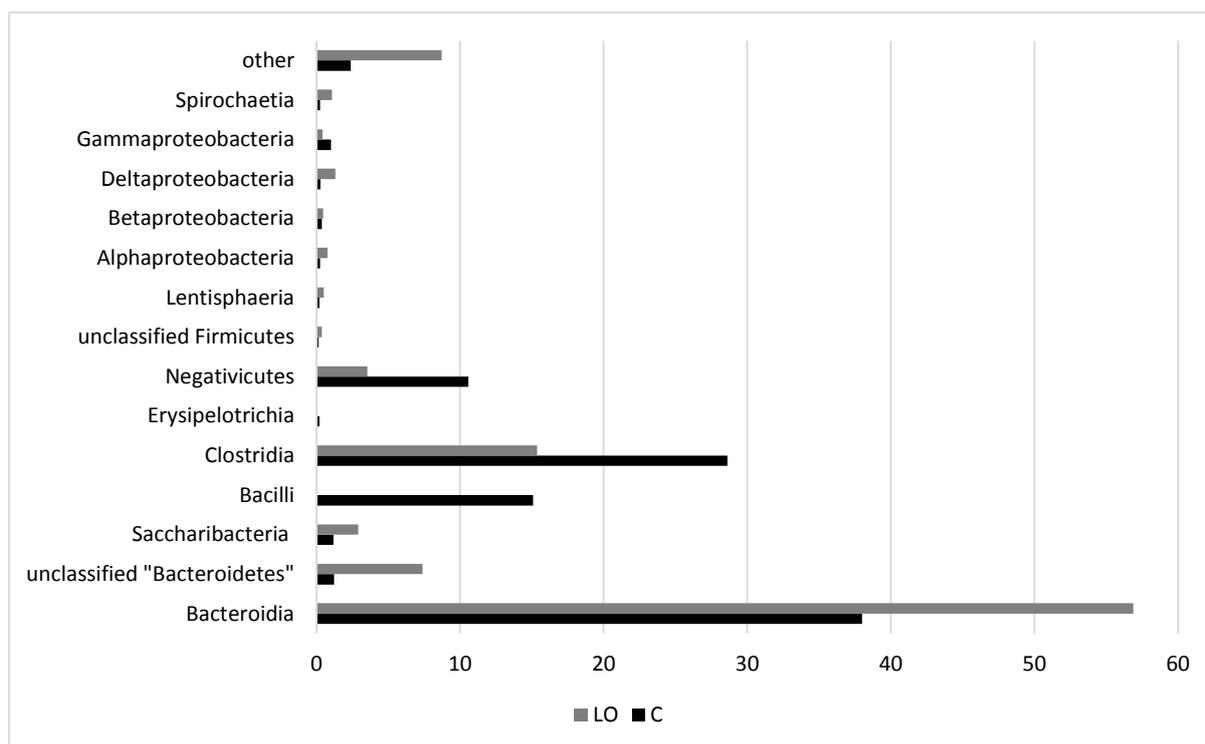


Рис. 3 – Таксономический состав микробиома рубцовой жидкости *in vitro* на уровне класса, %  
 Figure 3 – Class-level taxonomic composition of the ruminal fluid microbiome *in vitro*, %

В опытной группе относительно контроля отмечено повышение количества микроорганизмов, принадлежащих к классам *Saccharibacteria* в 2,8 раз, *Spirochaetia* – в 5 раз, *Actinobacteria* – в 1,3 раз, *Mollicutes* – в 2,2 раз, *Lentisphaeria* – в 2,1 раз, *Elusimicrobia* – в 17 раз. Также отмечено увеличение представителей всех классов филума *Proteobacteria* при сравнении с контролем на 44 % ( $P \leq 0,05$ ).

При введении льняного масла отмечено преобладание представителей семейства *Prevotellaceae*, которые составили 63,1 % от общего числа представителей всех семейств, при этом выше контрольных значений численность данных микроорганизмов была на 40 %. В опытной группе относительно контроля также отмечено повышение численности микробного состава рубца семейств *Bifidobacteriales*, *Porphyromonadaceae*, *Rikenellaceae* и некультивируемых *Bacteroidales*.

При включении льняного масла отмечено снижение численности амилотических микроорганизмов *Streptococcus bovis* на 99 % ( $P \leq 0,05$ ) относительно контроля, продуцирующих лактат, что приводит к увеличению ЛЖК-продуцирующих бактерий и интенсивности синтеза ЛЖК.

Также в исследовании при добавлении льняного масла отмечено наличие в рубцовой жидкости домена архей, в частности *Methanomassiliicoccales*, концентрация которых в опытной группе была выше на 97 % относительно контроля.

### Обсуждение полученных результатов.

Льняное масло, богатое линолевой кислотой, является одним из наиболее эффективных источников липидов, используемых в стратегиях снижения выбросов метана (Pitta DW et al., 2014). Льняное семя умеренно модифицирует структуру бактериального сообщества. Липиды, входящие в состав льняного семени, снижают относительное обилие водородпродуцирующих *Ruminococcaceae*, увеличивают долю бактерий, которые, как известно, уменьшают разложение сукцината до пропионата (Doreau M et al., 2014; Guyader J et al., 2015).

Олеиновая кислота (составляющая в среднем 20 % жирных кислот льняного масла) стимулировала рост *Selenomonas ruminantium* в чистых культурах (Maczulak AE et al., 1981). Однако для исследований *in vivo* результаты контрастны: *Selenomonas* был среди родов, объясняющих различия в структуре бактериального сообщества между ягнятами, получавшими льняную диету, и теми, кто получал контрольную диету (Lyons T et al., 2017), но не было никаких изменений в обилии *Selenomonas*, когда коров кормили подсолнечным маслом (30 % олеиновой кислоты) (Zened A et al., 2013). В данном исследовании установлено снижение численности порядка *Selenomonadales* на 62 % в рубцовой жидкости телят при дополнительном введении льняного масла. Добавление льняного масла, напротив, увеличивало обилие некультурных *Bacteroidetes* на 35,8 % ( $P \leq 0,05$ ) относительно контрольной группы. Добавление льняного масла также оказывало влияние на обилие, но не на разнообразие метаногенного сообщества рубца, следовательно, антиметаногенный потенциал жирных кислот льняного масла был связан с численностью архей в рубце, а не видовым составом.

*Ruminococcaceae* являются важной группой бактерий, обитающих в рубце, и способны разлагать полисахариды клеточной стенки растений на метаболизируемую энергию. Это означает, что повышение данного сообщества рубца повышает расщепление пищевых волокон. В настоящих исследованиях добавление льняного масла имело тенденцию к повышению переваримости СВ рациона и составило разницу 2,3 % ( $p \leq 0,05$ ). В текущем исследовании не было выявлено взаимосвязей между численностью важных таксонов и переваримостью корма. Это неудивительно, учитывая высокую способность микробных популяций приспосабливаться к диетическим изменениям, которые могли маскировать различия в эффективности кормов под влиянием изменений в микробных сообществах (Iwamoto M et al., 2002; Marais JP et al., 1988).

Соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (F:B) тесно связано с эффективностью корма у крупного рогатого скота (Jami E et al., 2014; Ramirez NA et al., 2012). Ramirez NA с коллегами (2012) обнаружили, что жировая добавка к рациону значительно снижала соотношение. Однако данные результаты не согласуются с исследованием, в котором не было отмечено значительного влияния липидов на соотношение F:B, что, возможно, связано с более высокими уровнями эфирного экстракта в диете (McGovern E et al., 2018). В своих исследованиях нами выявлено увеличение соотношения *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, которое составило 1:3,3 при дополнительном включении льняного масла, при этом в контроле данное соотношение было 1,4:1.

### Выводы.

Дополнительное включение льняного масла в рацион крупного рогатого скота способствовало увеличению видового разнообразия микробиома рубца, численности бактерий филума *Bacteroidetes*, а также представителей домена археи, участвующих в метаногенезе рубца. Полученные данные можно использовать при разработке рационов для молодняка крупного рогатого скота на откорме для повышения эффективности использования кормов и оптимизации стратегий снижения выбросов метана в окружающую среду.

### Исследования выполнены при поддержке РФФ. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (№ 20-16-00088)

#### Литература

1. Елина Е.Е. Биоразнообразие: метод. пособие для бакалавров направления подготовки «Экология и природопользование». Оренбург: Типография «Экспресс-печать», 2016. 36 с. [Elina EE. Bio-raznoobrazie: metod. posobie dlya bakalavrov napravleniya podgotovki «Ekologiya i prirodopol'zovanie». Orenburg: Tipografiya «Ekspress-pechat»; 2016:36 p. (In Russ)].
2. Зубцов В.А., Миневиц И.Э. Стратегия развития технологий в кормопроизводстве по использованию семян льна и продуктов их переработки // Вестник Всероссийского научно-исследовательского института механизации животноводства. 2015. № 4(20). С. 72-79. [Zubtsov VA, Minevich IE. The strategy of the technology development in forage production on the flax seeds and its products' processing use. Vestnik Vserossiiskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta mekhanizatsii zhivotnovodstva. 2015;4(20):72-79. (In Russ)].
3. Benchaar C, Romero-Pérez GA, Chouinard PY, Hassanat F, Eugene M, Petit HV, Côrtes C. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. J Dairy Sci. 2012;95(8):4578-4590. doi: 10.3168/jds.2012-5455
4. Brito AF, Zang Y. A review of lignan metabolism, milk enterolactone concentration, and antioxidant status of dairy cows fed flaxseed. Molecules. 2019; 24(1):41. doi: 10.3390/molecules24010041
5. Chung MWY, Lei B, Li-Chan ECY. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). Food Chemistry. 2005;90(1-2):271-279 doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.0389
6. Ding S, Meale SJ, Alazeh AY, He ML, Ribeiro GO, Jin L, Wang Y, Dugan MER, Chaves AV, McAllister TA. Effect of *Propionibacterium freudenreichii* in diets containing rapeseed or flaxseed oil on in vitro ruminal fermentation, methane production and fatty acid biohydrogenation. Animal Production Science. 2016;57(10):2051-2059. doi: 10.1071/AN15878
7. Doreau M, Bamière L, Pellerin S, Lherm M, Benoit M. Mitigation of enteric methane for French cattle: potential extent and cost of selected actions. Anim Prod Sci. 2014;54(9):1417-1422. doi: 10.1071/AN14207
8. Gushchin VV, Stefanova IL, Krasnyukov Yu N, Shakhnazarova LV. Influence of thermal heating on the fatty acid composition of turkey meat enriched with linseed oil. Theory and practice of meat processing. 2016;1:62-74. doi: <https://doi.org/10.21323/2114-441X-2016-1-62-74>
9. Guyader J, Eugène M, Meunier B, Doreau M, Morgavi DP, Silberberg M, Rochette Y, Gerard C, Loncke C, Martin C. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. J Anim Sci. 2015;93(7):3564-3577. doi: 10.2527/jas.2014-8196
10. Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. Anaerobe. 2002;8(4):209-215. doi: <https://doi.org/10.1006/anae.2002.0428>
11. Jami E, White BA, Mizrahi I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. PLOS ONE. 2014;9(1):e85423. doi: 10.1371/journal.pone.0085423
12. Kronberg SL, Scholljegerdes EJ, Murphy EJ, Ward RE, Maddock TD, Schauer CS. Treatment of flaxseed to reduce biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid by ruminal microbes in sheep and cattle, and

increase n-3 fatty acid concentrations in red meat. *Journal of Animal Science*. 2012;90(12):4618-4624. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4774>

13. Lyons T, Boland T, Storey S, Doyle E. Linseed oil supplementation of lambs' diet in early life leads to persistent changes in rumen microbiome structure. *Front Microbiol*. 2017;8:1656. doi: 10.3389/fmicb.2017.01656

14. Maczulak AE, Dehority BA, Palmquist DL. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1981;42(5):856-862. doi: 10.1128/aem.42.5.856-862.1981

15. Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kistner A, Dennison C. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *Br J Nutr*. 1988;59(2):301-313. doi: 10.1079/bjn19880037

16. Martin C, Ferlay A, Mosoni P, Rochette Y, Chilliard Y, Doreau M. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J Dairy Sci*. 2016; 99(5):3445-3456. doi: 10.3168/jds.2015-10110

17. McGovern E, Kenny AD, McCabe MS, Fitzsimons C, McGee M, Kelly AK, et al. 16S rRNA sequencing reveals relationship between potent cellulolytic genera and feed efficiency in the rumen of bulls. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:1842. doi: 10.3389/fmicb.2018.01842

18. Moallem U. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(10):8641-8661. doi: 10.3168/jds.2018-14772

19. Pitta DW, Kumar S, Vecchiarelli B, Shirley DJ, Bittinger K, Baker LD, Ferguson JD, Thomsen N. Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. *Journal of Animal Science*. 2014;92(9): 4014-4022. doi: 10.2527/jas.2014-7621

20. Ramirez HA, Nestor K, Tedeschi LO, Callaway TR, Dowd SE, Fernando SC et al. The effect of brown midrib corn silage and dried distillers' grains with solubles on milk production, nitrogen utilization and microbial community structure in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 2012.92(3):365-380 doi: 10.4141/cjas2011-133

21. RDP Announcements [Internet] [cited 2021 March 15] Available from: <http://rdp.cme.msu.edu>

22. SILVA. High Quality Ribosomal RNA databases [Internet] de.NBI. German network for bioinformatics infrastructure [cited 2021 March 15] Available from: <https://www.arb-silva.de>

23. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [Internet] BLAST. [cited 2021 March 15] Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

24. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [Internet] BLAST. Nucleotide BLAST [cited 2021 March 15] Available from: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

25. VAMPS Visualization and Analysis of Microbial Population Structures [Internet] The Josephine Bay Paul Center. [cited 2021 March 15] Available from: <http://vamps.mbl.edu>

26. Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, Troegeler-Meynadier A, Enjalbert F. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013;83(2):504-514 doi: 10.1111/1574-6941.12011

27. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger. *Bioinformatics*. 2014,30(5):614-620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593

#### References

1. Elina EE. Biodiversity: Method. manual for bachelors of the direction of training "Ecology and nature management". Publishing house "Express-printing"; 2016:36 p.

2. Zubtsov VA, Minevich IE. The strategy of the technology development in forage production on the flax seeds and its products' processing use. *Bulletin of the All-Russian Research Institute of Livestock Mechanization*. 2015;4(20):72-79.

3. Benchaar C, Romero-Pérez GA, Chouinard PY, Hassanat F, Eugene M, Petit HV, Côrtes C. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 2012;95(8):4578-4590. doi: 10.3168/jds.2012-5455
4. Brito AF, Zang Y. A review of lignan metabolism, milk enterolactone concentration, and antioxidant status of dairy cows fed flaxseed. *Molecules.* 2019; 24(1):41. doi: 10.3390/molecules24010041
5. Chung MWY, Lei B, Li-Chan ECY. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chemistry.* 2005;90(1-2):271-279. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.0389
6. Ding S, Meale SJ, Alazeh AY, He ML, Ribeiro GO, Jin L, Wang Y, Dugan MER, Chaves AV, McAllister TA. Effect of *Propionibacterium freudenreichii* in diets containing rapeseed or flaxseed oil on in vitro ruminal fermentation, methane production and fatty acid biohydrogenation. *Animal Production Science.* 2016;57(10):2051-2059. doi:10.1071/AN15878
7. Doreau M, Bamière L, Pellerin S, Lherm M, Benoit M. Mitigation of enteric methane for French cattle: potential extent and cost of selected actions. *Anim Prod Sci.* 2014;54(9):1417-1422. doi: 10.1071/AN14207
8. Gushchin VV, Stefanova IL, Krasnyukov Yu N, Shakhnazarova LV. Influence of thermal heating on the fatty acid composition of turkey meat enriched with linseed oil. Theory and practice of meat processing. 2016;1:62-74. doi: <https://doi.org/10.21323/2114-441X-2016-1-62-74>
9. Guyader J, Eugène M, Meunier B, Doreau M, Morgavi DP, Silberberg M, Rochette Y, Gerard C, Loncke C, Martin C. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *J Anim Sci.* 2015;93(7):3564-3577. doi: 10.2527/jas.2014-8196
10. Iwamoto M, Asanuma N, Hino T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe.* 2002;8(4):209-215. doi: <https://doi.org/10.1006/anae.2002.0428>
11. Jami E, White BA, Mizrahi I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLOS ONE.* 2014;9(1):e85423. doi: 10.1371/journal.pone.0085423
12. Kronberg SL, Scholljegerdes EJ, Murphy EJ, Ward RE, Maddock TD, Schauer CS. Treatment of flaxseed to reduce biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid by ruminal microbes in sheep and cattle, and increase n-3 fatty acid concentrations in red meat. *Journal of Animal Science.* 2012;90(12):4618-4624. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4774>
13. Lyons T, Boland T, Storey S, Doyle E. Linseed oil supplementation of lambs' diet in early life leads to persistent changes in rumen microbiome structure. *Front Microbiol.* 2017;8:1656. doi: 10.3389/fmicb.2017.01656
14. Maczulak AE, Dehority BA, Palmquist DL. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1981;42(5):856-862. doi: 10.1128/aem.42.5.856-862.1981
15. Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kistner A, Dennison C. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *Br J Nutr.* 1988;59(2):301-313. doi: 10.1079/bjn19880037
16. Martin C, Ferlay A, Mosoni P, Rochette Y, Chilliard Y, Doreau M. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J Dairy Sci.* 2016; 99(5):3445-3456. doi: 10.3168/jds.2015-10110
17. McGovern E, Kenny AD, McCabe MS, Fitzsimons C, McGee M, Kelly AK, et al. 16S rRNA sequencing reveals relationship between potent cellulolytic genera and feed efficiency in the rumen of bulls. *Frontiers in Microbiology.* 2018;9:1842. doi: 10.3389/fmicb.2018.01842
18. Moallem U. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 2018;101(10):8641-8661. doi: 10.3168/jds.2018-14772

19. Pitta DW, Kumar S, Vecchiarelli B, Shirley DJ, Bittinger K, Baker LD, Ferguson JD, Thomsen N. Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. *Journal of Animal Science*. 2014;92(9): 4014-4022. doi: 10.2527/jas.2014-7621
20. Ramirez HA, Nestor K, Tedeschi LO, Callaway TR, Dowd SE, Fernando SC et al. The effect of brown midrib corn silage and dried distillers' grains with solubles on milk production, nitrogen utilization and microbial community structure in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 2012.92(3):365-380 doi: 10.4141/cjas2011-133
21. RDP Announcements [Internet] [cited 2021 March 15] Available from: <http://rdp.cme.msu.edu>
22. SILVA. High Quality Ribosomal RNA databases [Internet] de.NBI. German network for bioinformatics infrastructure [cited 2021 March 15] Available from: <https://www.arb-silva.de>
23. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [Internet] BLAST. [cited 2021 March 15] Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
24. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [Internet] BLAST. Nucleotide BLAST [cited 2021 March 15] Available from: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
25. VAMPS Visualization and Analysis of Microbial Population Structures [Internet] The Josephine Bay Paul Center. [cited 2021 March 15] Available from: <http://vamps.mbl.edu>
26. Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, Troegeler-Meynadier A, Enjalbert F. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013;83(2):504-514 doi: 10.1111/1574-6941.12011
27. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger. *Bioinformatics*. 2014,30(5):614-620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593

**Шейда Елена Владимировна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, сот.: 8-922-862-64-02, e-mail: [elena-shejjda@mail.ru](mailto:elena-shejjda@mail.ru); старший научный сотрудник экспериментально-биологической клиники, Оренбургский государственный университет, пр. Победы, 13, г. Оренбург, РФ. Тел.: 89228626402. E-mail: [elena-snejjda@mail.ru](mailto:elena-snejjda@mail.ru).

**Лебедев Святослав Валерьевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний и экспертиз, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8-912-345-87-38, e-mail: [lsv74@list.ru](mailto:lsv74@list.ru).

**Мирошников Сергей Александрович**, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)30-81-70, e-mail: [vniiims.or@mail.ru](mailto:vniiims.or@mail.ru); врио ректора, Оренбургский государственный университет, 460018, г. Оренбург, просп. Победы, д. 13, тел.: (3532) 77-67-70, e-mail: [rector\\_osu@mail.osu.ru](mailto:rector_osu@mail.osu.ru)

**Гречкина Виктория Владимировна**, кандидат биологических наук, и.о. заведующего лабораторией биологических испытаний и экспертиз, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29; доцент кафедры незаразных болезней животных, Оренбургский государственный аграрный университет, 460000, ул. Челюскинцев 18, тел. 8-922-877-14-97, e-mail: [Viktoria1985too@mail.ru](mailto:Viktoria1985too@mail.ru)

**Рязанов Виталий Александрович**, кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532) 30-81-70, e-mail: [vita7456@yandex.ru](mailto:vita7456@yandex.ru)

**Дускаев Галимжан Калиханович**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук; 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: +7 (35-32)30-81-70, e-mail: gduskaev@mail.ru.

**Рахматуллин Шамиль Гафиуллинович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 89228157225, e-mail: shahm2005@rambler.ru.

Поступила в редакцию 27 мая 2021 г.; принята после решения редколлегии 15 июня 2021 г.; опубликована 30 июня 2021 г. / Received: 27 May 2021; Accepted: 15 June 2021; Published: 30 June 2021