

УДК 636.085:636.085.57

DOI: 10.33284/2658-3135-104-3-186

**Изменение таксономического состава микробиома кишечника крупного рогатого скота, выращиваемого на белковом рационе**

***Е.В. Шейда, С.В. Лебедев, В.А. Рязанов, В.В. Гречкина, О.В. Кван, Ш.Г. Рахматуллин***

*Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук (г. Оренбург)*

**Резюме.** В данной работе изучено изменение таксономического состава микробиома кишечника крупного рогатого скота при включении в рацион белковых компонентов. Анализ кишечной микрофлоры проводили с помощью MiSeq («Illumina», США) методом секвенирования нового поколения с набором реагентов MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle). При дополнительном введении в рацион белковых компонентов – подсолнечного жмыха доминирующими филумами также оказались *Firmicutes* (48,2 % от общего числа особей всех видов), *Bacteroidetes* (36,8 %), *Verrucomicrobia* (12,7 %). Включение подсолнечного жмыха способствовало снижению численности микробиоты на 23,7 % относительно контроля ( $P \leq 0,05$ ), при этом биомасса представителей семейства *Ruminococcaceae* относительно контроля снизилась на 24,1 %, количество *unclassified Clostridiales* в данном образце была выше на 19 %, чем в контроле. Дополнительное введение соевого шрота снижало число бактериальных последовательностей относительно контроля на 36,6 % ( $P \leq 0,05$ ), которая составила 15211. Видовой состав был представлен 8 филумами, 15 классами, 33 семействами и 64 родами. Снижение  $\alpha$ -разнообразия фекального микробиома в опытных группах оказывало влияние и на  $\beta$ -разнообразие, отмечено частичное совпадение сообществ в контрольной и опытной группах, индексы сходства микробиоценозов Жаккара и Серенсена оказались равны  $K_j = 0,5-0,67$  и  $K_c = 0,6-0,76$ .

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, микробиом, фекальная микрофлора, биоразнообразие, подсолнечный жмых, соевый шрот.

UDC 636.085:636.085.57

**Changes in the taxonomic composition of the intestinal microbiome of cattle raised on a protein diet**

***Elena V Sheyda, Svyatoslav V Lebedev, Vitaly A Ryazanov, Victoria V Grechkina, Olga V Kwan, Shamil G Rakhmatullin***

*Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)*

**Abstract.** In this work, we studied the change in the taxonomic composition of the intestinal microbiome of cattle with the inclusion of protein components in the diet. The intestinal microflora was analyzed using MiSeq (Illumina, USA) according to a new generation sequencing method with the MiSeq® Reagent Kit v3 (600 cycle). With the additional introduction of protein components into the diet - sunflower cake, the dominant phyla also turned out to be *Firmicutes* (48.2% of the total number of individuals of all species), *Bacteroidetes* (36.8%), *Verrucomicrobia* (12.7%). The inclusion of sunflower oil cake contributed to a decrease in the number of microbiota by 23.7% relative to the control ( $P \leq 0.05$ ), while the biomass of representatives of the *Ruminococcaceae* family relative to the control decreased by 24.1%, the number of *unclassified Clostridiales* in this sample was 19% higher than in control. Additional introduction of soybean meal reduced the number of bacterial sequences relative to the control by 36.6% ( $P \leq 0.05$ ), which was 15211. The species composition was represented by 8 phyla, 15 classes, 33 families and 64 genera. A decrease in the  $\alpha$ -diversity of the fecal microbiome in the experimental groups also had an effect on  $\beta$ -diversity, there was a partial coincidence of communities in the control and experimental groups, the indices of similarity of Jaccard and Sørensen microbiocenoses were equal to  $K_1 = 0.5-0.67$  and  $K_c = 0.6-0.76$ .

**Keywords:** cattle, microbiome, fecal microflora, biodiversity, sunflower cake, soybean meal.

### **Введение.**

Из-за высокой потребности в энергии продуктивный крупный рогатый скот получает высокопитательные рационы, что обычно ставит под угрозу состояние желудочно-кишечного тракта, вызывая подострый руминальный ацидоз и ацидоз толстого отдела кишечника. Эти нарушения могут снижать использование питательных веществ, ухудшать функциональные возможности желудочно-кишечной микробиоты и снижать абсорбционную и барьерную способности желудочно-кишечного эпителия, а также вызывать воспалительные реакции. Появление ацидотических явлений повышает кислотность и снижает доступность субстратов для микроорганизмов в рубце и кишечнике, и может привести к дисбиозу микробиоты, характеризующейся низким разнообразием и функциональностью (Plaizier JC et al., 2018).

В настоящее время в большом количестве исследований используется высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК бактерий желудочно-кишечного тракта при различных экспериментальных параметрах. Определение таксономического состава микробиома ЖКТ может служить основой для коррекции и улучшения рационов (Шейда Е.В. и др., 2020а; 2020б).

В некоторых работах определены таксоны, которые являются общими почти для всех образцов микробиоты из желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота, а также таксоны, которые сильно связаны либо с рубцом, либо с фекалиями. Метаногенные роды *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera* были идентифицированы почти во всех образцах фекалий и рубца (>99,1 %), а также бактериальные роды *Prevotella* и *Ruminococcus* ( $\geq 92,9$  %). Бактериальные роды, такие как *Alistipes*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* и *Escherichia/Shigella*, были связаны с фекалиями, а *Fibrobacter*, *Prevotella*, *Ruminococcus* и *Succiniclasticum* – с рубцом (Holman DB and Gzyl KE, 2019).

Обеспечение растущего молодняка крупного рогатого скота незаменимыми аминокислотами введением в рационы протеинсодержащих кормов, обладающих низкой расщепляемостью в рубце и хорошей переваримостью в кишечнике, способствует получению высоких привесов в более короткие сроки выращивания (Фицев А.И. и др., 2003). Белковые добавки увеличивают прирост мышечной массы и рост животного в целом, однако их влияние на другие органы или системы менее известно. Изменение диеты может вызвать дисбаланс кишечной микробиоты с позитивными или негативными последствиями для животного (Lee C et al., 2012).

Микробиом желудочно-кишечного тракта жвачных животных представляет собой сложную, динамичную экосистему, тесно связанную с питанием, обменом веществ и иммунитетом животного-хозяина. Экология, физиологические особенности, структура колоний и бактериальное разнообразие кишечной микробиоты жвачных животных являются предметом многочисленных исследований (Liu J et al., 2019; Singh KM et al., 2012; Dai X et al., 2012; Hess M et al., 2011; Frey JC et al., 2006; Eckburg PV et al., 2005). В своей работе мы провели пилотное исследование микробиоты, выделенной из фекалий молодняка крупного рогатого скота, чьи рационы были дополнены белковой добавкой.

### **Цель исследования.**

Изучение таксономического состава желудочно-кишечного микробиома молодняка крупного рогатого скота при дополнительном введении белковых компонентов в рацион.

### **Материалы и методы исследования.**

**Объект исследования.** Каловые массы от бычков казахской белоголовой породы.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с инструкциями и рекомендациями российских нормативных актов (1987 г.; Приказ Минздрава СССР No 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 для обеспечения минимума страданий животных и уменьшения количества исследуемых опытных образцов.

**Схема эксперимента.** Эксперимент проводился в двух повторностях с использованием латинского квадрата 4×4 в лаборатории биологических испытаний и экспертиз Федерального научного центра биологических систем и агротехнологий Российской академии наук. Изучение микробиома ЖКТ осуществляли на 4 телятах казахской белоголовой породы в возрасте 8 месяцев со средней массой 220-225 кг, от которых получали каловые массы. Фекалии отбирали утром перед кормлением животного из ампулообразного расширения прямой кишки.

Животных содержали в отдельных метаболических клетках (1,0×2,2 м) для сбора фекалий, в помещении с оптимальными параметрами температуры и влажности, со свободным доступом к воде. В течение экспериментального периода, температура окружающей среды поддерживалась между +23 °С и +25 °С.

Экспериментальные диеты были сбалансированы с учётом потребности организма бычков и отличались на 4 % по содержанию сухого вещества и на 3,4 % – клетчатки. Рацион включал: сено разнотравное (6,5 кг), смесь концентратов (2,3 кг), дикальцийфосфат 35 г, соль поваренная 35 г, дополнительно вводили белковый компонент (подсолнечный жмых и соевый шрот) 5 % от сухого вещества рациона. Животных кормили два раза в сутки, в равных долях, утром и вечером.

Бычки контрольной группы получали стандартный рацион, животным I группы дополнительно включали в рацион подсолнечный жмых, а II группы – соевый шрот. Учётный период составил 7 суток.

**Метагеномный анализ кишечного содержимого.** Микробное биоразнообразие фекальной микрофлоры проводили с помощью MiSeq («Illumina», США) методом секвенирования нового поколения 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 отобранные пробы 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 TE-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 рНК. 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 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 (National Center for Biotechnological Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и выравненных последовательностей генов рибосомальной РНК SILVA (<https://www.arb-silva.de>). Для биоинформатической обработки результатов используется программа PEAR (Pair-End Assembler, PEAR v0.9.8) (Zhang J et al., 2014).

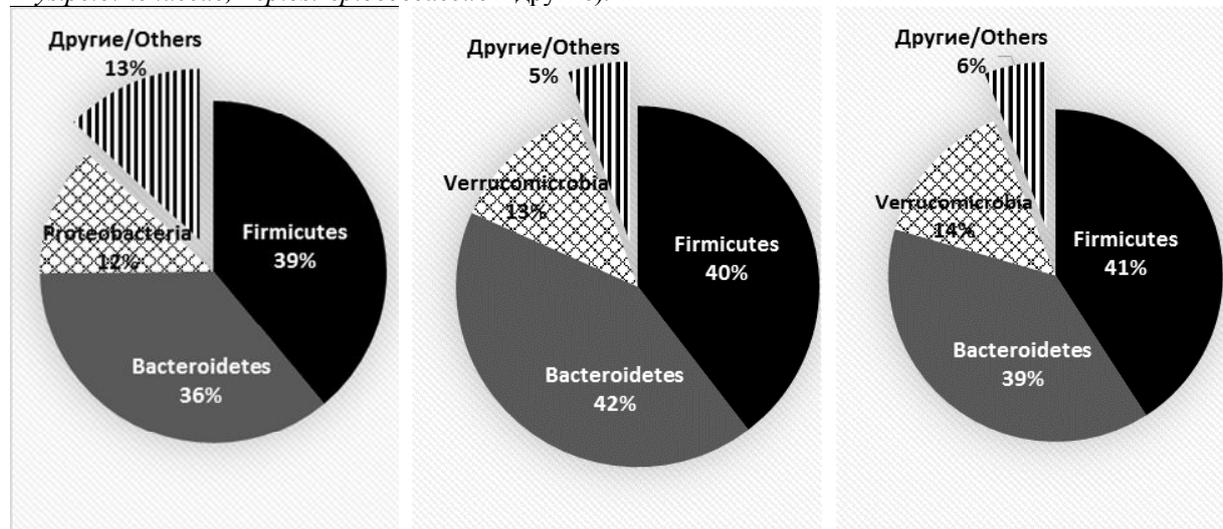
**Оборудование и технические средства.** Лабораторные исследования проводили в Центре коллективного пользования ФНЦ БСТ РАН (аттестат аккредитации № RA.RU.21ПФ59 от 02.12.15).

Для отбора проб использовали шприц-дозатор Экохим ОПА-2-20 (ООО «Экротек», г. Санкт-Петербург, Россия), микропробирки «Eppendorf»

**Статистическая обработка.** Результаты секвенирования обрабатывали с помощью офисного программного комплекса «Microsoft Office» с применением программы «Excel» («Microsoft», США). Рассчитывали также индексы биоразнообразия Шеннона (H'), Симпсона (D), индексы сходства микробиоценозов Жаккара и Серенсена (Елина Е.Е., 2016).

### Результаты исследования.

Заселяющая ЖКТ микрофлора обеспечивает переваримость и усвояемость питательных веществ и оказывает влияние на течение метаболических процессов в организме. Микробиота кишечника формирует высокую степень резистентности по отношению к патогенным микроорганизмам. Обогащение рационов дополнительными высокопитательными компонентами приводит к дисбалансу количественного и качественного состава микробиома. При изучении генетического разнообразия кишечной микрофлоры молодняка крупного рогатого скота выявлено численное доминирование представителей филума *Firmicutes* (44,3 % от общего числа особей всех видов), вторым по численности отмечен филум *Bacteroidetes* – 40,8 %, на долю филума *Proteobacteria* пришлось 14 %, численность бактерий других филумов не превышала 1%. В контрольной группе биоразнообразие представлено 8 филумами, 16 классами, 31 семейством и 71 родом, а общее число бактериальных последовательностей составило 23989 (рис. 1). На уровне семейства преобладающими оказались *Ruminococcaceae* (28,7 %), *unclassified "Bacteroidales"* (18,6 %), третьим – *Enterobacteriaceae* (13,6 %), далее – семейства *Bacteroidaceae* (11,9 %), *Lachnospiraceae* (7,8 %), *Prevotellaceae* (5,3 %), *unclassified Clostridiales* (3,8 %), *Porphyromonadaceae* (3,6 %). Численность других семейств в совокупности составила 39,16 % (*Rikenellaceae*, *unclassified Firmicutes*, *Bifidobacteriales*, *Erysipelotrichaceae*, *Peptostreptococcaceae* и другие).



Контроль/Control

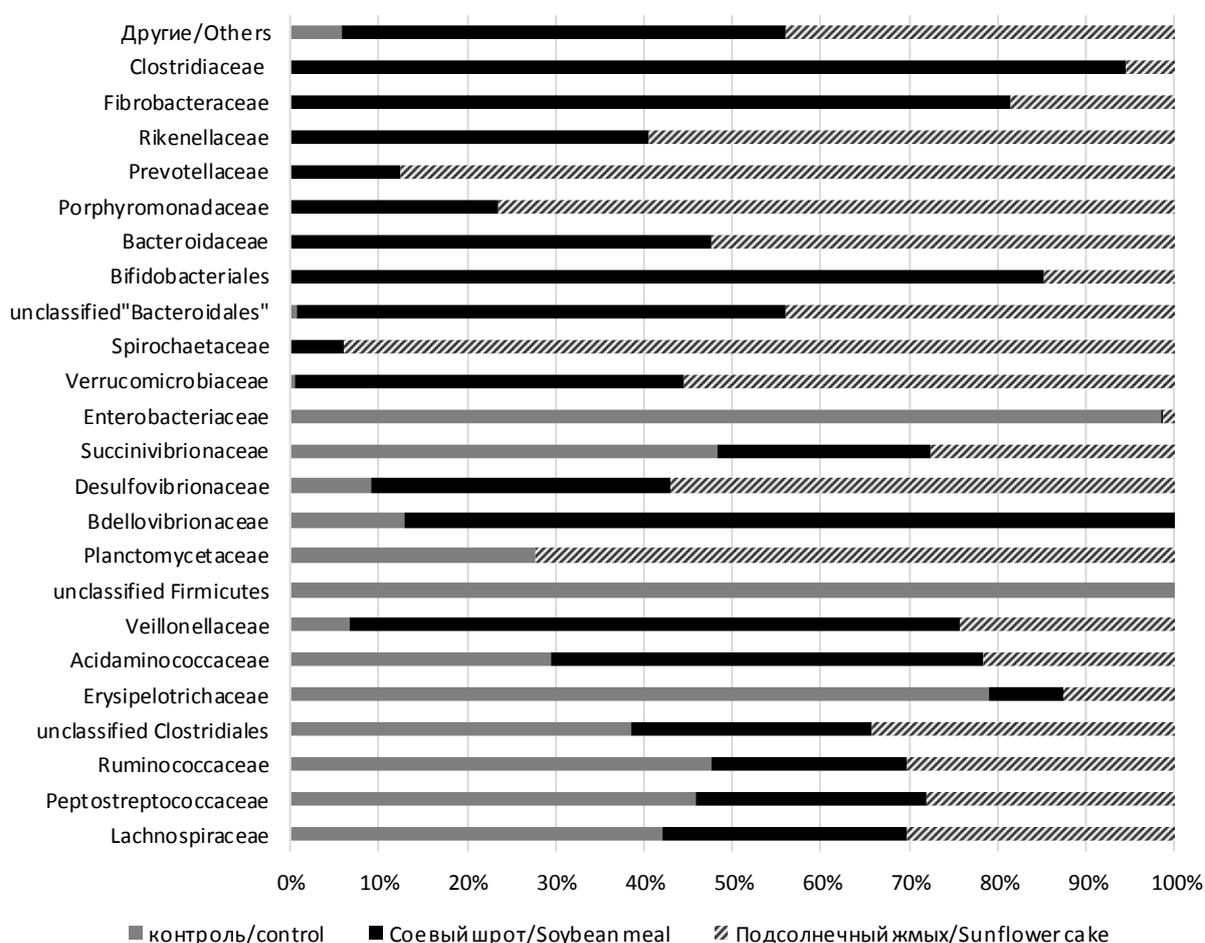
Подсолнечный жмых/  
Sunflower cake

Соевый шрот/  
Soybean meal

**Рис. 1 – Таксономический состав фекальной микрофлоры при дополнительном включении белковых компонентов на уровне семейства, %**

**Figure 1 – Taxonomic composition of fecal microflora with additional inclusion of protein components at a family level, %**

При дополнительном введении в рацион белкового компонента – подсолнечного жмыха отмечено наличие 10 филумов, 16 классов, 33 семейства и 45 родов, ОУТ – 17435. Доминирующими филумами также оказались *Firmicutes* (48,2 % от общего числа особей всех видов), *Bacteroidetes* (36,8 %), *Verrucomicrobia* (13 %). Введение подсолнечного жмыха способствовало снижению численности микробиоты на 23,7 % ( $P \leq 0,05$ ), при этом количество представителей семейства *Ruminococcaceae* снизилось на 24,1 % относительно контрольной группы. В данной опытной группе число *unclassified Clostridiales* было выше на 19 %, *Lachnospiraceae* на 14 % и *Bifidobacteriales* на 40,2 % по сравнению с контрольным образцом. Относительно контроля не были обнаружены представители *Synergistetes* и *Planctomycetes* (рис. 2).



Примечание: в группу «Другие» объединены таксоны, численность каждого из которых не превышает 1 % от общего числа  
 Note: the group "Others" includes taxa, the number of each of which does not exceed 1% of the total

**Рис. 2 – Таксономический состав фекальной микрофлоры при дополнительном включении белковых компонентов на уровне семейства, %**  
**Figure 2 – Taxonomic composition of fecal microflora with additional inclusion of protein components at the family level, %**

Замена контрольного рациона на рацион с включением белкового компонента – соевого шрота снижало численность бактериальной массы относительно контроля на 36,6 % ( $P \leq 0,05$ ), ОУТ – 15211. При этом видовой состав был представлен 8 филумами, 15 классами, 33 семействами и 64 родами. Относительно контроля отмечено достоверное снижение численности представителей семейства *Ruminococcaceae* на 53,4 % ( $P \leq 0,05$ ), *unclassified Clostridiales* на 30 %, *Lachnospiraceae* на 34,3 %, *Enterobacteriaceae* на 99,8 % ( $P \leq 0,05$ ), численность представителей семейств *Bifidobacteriales*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, напротив, в данной группе повышалась.

Дополнительное включение в рацион крупного рогатого скота белковых компонентов, не зависимо от источника протеина, способствовало увеличению численности микроорганизмов, относящихся к семействам *Verrucomicrobiaceae* на 98,5-98,8 % ( $P \leq 0,05$ ), а также появлению в опытных группах семейств *Bacteroidales*, *Bifidobacteriales*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Fibrobacteraceae*, *Clostridiaceae*, тогда как в контрольной группе представители данных семейств не обнаружены.

Значения параметров  $\alpha$ -биоразнообразия в контрольной и I опытной группах показали одинаковые значения по индексам Шеннона ( $H'$ ) и доминирования Симсона ( $D$ ), их значения были равны  $H'=1,1$ ,  $D=0,38$ , а при включении в рацион подсолнечного жмыха индекс Шеннона составил 0,9, индекс Симсона –  $D=0,49$ . Введение в рацион соевого шрота способствовало увеличению  $\alpha$ -биоразнообразия, индекс Шеннона составил 1,4, при этом индекс Симсона –  $D=0,34$ .

Изменение  $\alpha$ -разнообразия фекального микробиома в опытных группах оказывало влияние и на  $\beta$ -разнообразие. Так, рассчитанные индексы сходства микробиоценозов Жаккара и Серенсена между контрольной группой и группой, получавшей подсолнечный жмых, оказались равны  $K_j=0,5$  и  $K_s=0,67$ , что свидетельствует о частичном совпадении сообществ в контрольной и опытных группах. Между контрольной и группой, получавшей соевый шрот,  $K_j=0,6$  и  $K_s=0,76$ .

#### **Обсуждение полученных результатов.**

В целом разнообразие микрофлоры в желудочно-кишечном тракте телят является схожим с результатами, полученными ранее (Thoetkiattikul H et al., 2013; Golder H et al., 2014). *Firmicutes* и *Bacteroidetes* были преобладающими типами в фекалиях крупного рогатого скота (Kim M and Wells JE, 2016).

Определение состава и структуры микробиома ЖКТ важно, но этот тип микробиома имеет высокую функциональную избыточность (Weimer PJ et al., 2015), и нами также показано, что филогенетические изменения в микробиоме кишечника при применении различных добавок не обязательно сопровождаются функциональными изменениями (Turnbaugh PJ, 2009). Поэтому важно охарактеризовать микробиом желудочно-кишечного тракта с точки зрения его функционального разнообразия и особенностей, а также определить влияние на данные различия составляющих рациона.

Изменения в рационе питания могут вызвать дисбаланс микробиоты кишечника с благоприятными или вредными последствиями для хозяина. В нашем исследовании установлено, что дополнительное введение белковых компонентов увеличивает обилие типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* и таксонов, связанных со здоровьем, таких как *Bifidobacteriales*, способных продуцировать карбоновые и короткоцепочечные жирные кислоты, тем самым препятствовать развитию гнилостной микрофлоры, а также повышать переваривание углеводов, улучшать использование азотистых соединений, образуя некоторые незаменимые аминокислоты. Данные факторы будут наилучшим образом сказываться на развитии телят (Matthews C et al., 2019).

Включение в рацион подсолнечного жмыха и соевого шрота способствует увеличению обилия типа *Bacteroidetes*, что согласуется с тем фактом, что виды, принадлежащие к этому типу, обладают протеолитической активностью (Macfarlane GT et al., 1986; Macfarlane GT et al., 1988). Таким образом, возможно, что повышенный уровень белка через добавку увеличит доступность субстрата для этих бактерий, поддерживая их рост по сравнению с другими бактериями типа *Firmicutes*.

### **Выводы.**

Таким образом, необходимо проведение дальнейших исследований, так как нет однозначного заключения о положительном или негативном влиянии белковых компонентов на микробиом кишечника.

### **Исследования выполнены в соответствии с планом НИР на 2021-2023 гг. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН (№ 0761-2019-0005)**

#### Литература

1. Елина Е.Е. Биоразнообразие: метод. пособие для бакалавров направления подготовки «Экология и природопользование». Оренбург: Типография «Экспресс-печать», 2016. 36 с. [Elina EE. Bioraznoobrazie: metod. posobie dlya bakalavrov napravleniya podgotovki «Ekologiya i prirodopol'zovanie». Orenburg: Tipografiya «Ekspress-pechat'»; 2016:36 p. (*In Russ*)].
2. Изменение активности пищеварительных ферментов панкреатического сока под влиянием ультрадисперсных частиц CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на фоне скармливания белковых рационов при выращивании крупного рогатого скота / Е.В. Шейда, С.В. Лебедев, С.А. Мирошников, В.В. Гречкина, В.А. Рязанов, О.В. Шошина // Животноводство и кормопроизводство. 2020а. Т. 103. № 4. С. 26-36. [Sheyda EV, Lebedev SV, Miroshnikov SA, Grechkina VV, Ryazanov VA, Shoshina OV. Changes in the activity of digestive enzymes of pancreatic juice under the influence of ultrafine particles of CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> against the background of feeding with protein diets raising cattle. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2020a;103(4):26-36. (*In Russ*)]. doi: 10.33284/2658-3135-103-4-26
3. Оценка влияния ультрадисперсных частиц CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на метаболические процессы в организме телят, выращиваемых на белковых рационах / Е.В. Шейда, С.В. Лебедев, С.А. Мирошников, В.В. Гречкина, В.А. Рязанов // Животноводство и кормопроизводство. 2020б. Т. 103. № 4. С. 14-25. [Sheyda EV, Lebedev SV, Miroshnikov SA, Grechkina VV, Ryazanov VA. Assessment of influence of ultrafine particles of CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on metabolic processes in the body of calves raised on protein diets. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2020b;103(4):14-25. (*In Russ*)]. doi: 10.33284/2658-3135-103-4-14
4. Фицев А.И., Григорьев Н.Г., Гаганов А.П. Современная оценка энергетической и протеиновой питательности растительных кормов // Кормопроизводство. 2003. № 12. С. 29-32. [Fitsev AI, Grigor'ev NG, Gaganov AP. Sovremennaya otsenka energeticheskoi i proteinovoi pitatel'nosti rastitel'nykh kormov. *Kormoproizvodstvo*. 2003;12:29-32. (*In Russ*)].
5. Dai X, Zhu YX, Luo YF, Song L, Liu D, Liu L et al. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen. *Plos One*. 2012;7(7): e40430. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040430>
6. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728): 1635-1638. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
7. Frey JC, Rothman JM, Pell AN, Nizeyi JB, Cranfield MR, Angert ER. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(5):3788-3792. doi: 10.1128/AEM.72.5.3788-3792.2006
8. Golder HM, Denman SE, McSweeney CM, Celi P, Lean IJ. Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. *J Dairy Sci*. 2014;97:5131-5150. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8003>
9. Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim TW, Chokhawala H, Schroth G et al. Metagenomic discovery of bio-mass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*. 2011;331(6016):463-467. doi: 10.1126/science.1200387
10. Holman DB, Gzyl KE. A meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*. 2019;95(6):fiz072. doi: 10.1093/femsec/fiz072
11. Kim M, Wells JE. A meta-analysis of bacterial diversity in the feces of cattle. *Curr Microbiol*. 2016;72(2):145-151. doi: 10.1007/s00284-015-0931-6
12. Lee C, Hristov AN, Heyler KS, Cassidy TW, Lapierre H, Varga GA, Parys C. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(9):5253-5268. doi: 10.3168/jds.2012-5366

13. Liu J, Taft DH, Maldonado-Gomez MX, Johnson D, Treiber ML, Lemay DG, DePeters EJ, Mills DA. The fecal resistome of dairy cattle is associated with diet during nursing. *Nat Commun.* 2019;10(1):4406. doi: 10.1038/s41467-019-12111-x
14. Macfarlane GT, Allison C, Gibson SA, Cummings JH. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 1988;64(1):37-46. doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb02427.x
15. Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiology.* 1986;132(6):1647-1656. doi: 10.1099/00221287-132-6-1647
16. Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes.* 2019;10(2):115-132. doi: 10.1080/19490976.2018.1505176
17. Plaizier JC, Mesgaran MD, Derakhshani H, Golder H, Khafipour E, Kleen JL, Lean I, Loor J, Penner G, Zebeli Q. Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal.* 2018;12(s2):s399-s418. doi: 10.1017/S1751731118001921
18. RDP Announcements [Internet] [cited 2021 March 15] Available from: <http://rdp.cme.msu.edu>
19. 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>
20. Singh KM, Ahir VB, Tripathi AK, Ramani UV, Sajani M, Koringa PG et al. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: a preliminary study. *Mol Biol Rep.* 2012;39:4841-4848. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1278-0>
21. Thoetkiattikul H, Mhuanong W, Laothanachareon T, Tangphatsornruang S, Pattarajinda V, Eurwilaichitr L, Champreda V. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Curr. Microbiol.* 2013;67(2):130-137. doi: 10.1007/s00284-013-0336-3
22. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480-484. doi: 10.1038/nature07540
23. 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)
24. 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>
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. Weimer PJ. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front Microbiol.* 2015;6:296. doi: 10.3389/fmicb.2015.00296
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 training programme "Ecology and nature management". Orenburg: Express Printing Printing House; 2016:36 p.
2. Sheyda EV, Lebedev SV, Miroshnikov SA, Grechkina VV, Ryazanov VA, Shoshina OV. Changes in the activity of digestive enzymes of pancreatic juice under the influence of ultrafine particles of CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> against the background of feeding with protein diets raising cattle. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2020a;103(4):26-36. doi: 10.33284/2658-3135-103-4-26
3. Sheyda EV, Lebedev SV, Miroshnikov SA, Grechkina VV, Ryazanov VA. Assessment of influence of ultrafine particles of CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on metabolic processes in the body of calves raised on protein diets. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2020b;103(4):14-25. doi: 10.33284/2658-3135-103-4-14

4. Fitsev AI, Grigorev NG, Gaganov AP. Modern assessment of energy and protein nutritional value of plant feed. *Feed Production*. 2003;12:29-32.
5. Dai X, Zhu YX, Luo YF, Song L, Liu D, Liu L et al. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen. *Plos One*. 2012;7(7): e40430. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040430>
6. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728): 1635-1638. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
7. Frey JC, Rothman JM, Pell AN, Nizeyi JB, Cranfield MR, Angert ER. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(5):3788-3792. doi: 10.1128/AEM.72.5.3788-3792.2006
8. Golder HM, Denman SE, McSweeney CM, Celi P, Lean IJ. Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. *J Dairy Sci*. 2014;97:5131-5150. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8003>
9. Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim TW, Chokhawala H, Schroth G et al. Metagenomic discovery of bio-mass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*. 2011;331(6016):463-467. doi: 10.1126/science.1200387
10. Holman DB, Gzyl KE. A meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*. 2019;95(6):fiz072. doi: 10.1093/femsec/fiz072
11. Kim M, Wells JE. A meta-analysis of bacterial diversity in the feces of cattle. *Curr Microbiol*. 2016;72(2):145-151. doi: 10.1007/s00284-015-0931-6
12. Lee C, Hristov AN, Heyler KS, Cassidy TW, Lapierre H, Varga GA, Parys C. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(9):5253-5268. doi: 10.3168/jds.2012-5366
13. Liu J, Taft DH, Maldonado-Gomez MX, Johnson D, Treiber ML, Lemay DG, DePeters EJ, Mills DA. The fecal resistome of dairy cattle is associated with diet during nursing. *Nat Commun*. 2019;10(1):4406. doi: 10.1038/s41467-019-12111-x
14. Macfarlane GT, Allison C, Gibson SA, Cummings JH. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J Appl. Bacteriol*. 1988;64(1):37-46. doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb02427.x
15. Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiology*. 1986;132(6):1647-1656. doi: 10.1099/00221287-132-6-1647
16. Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*. 2019;10(2):115-132. doi: 10.1080/19490976.2018.1505176
17. Plaizier JC, Mesgaran MD, Derakhshani H, Golder H, Khafipour E, Kleen JL, Lean I, Loor J, Penner G, Zebeli Q. Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*. 2018;12(s2):s399-s418. doi: 10.1017/S1751731118001921
18. RDP Announcements [Internet] [cited 2021 March 15] Available from: <http://rdp.cme.msu.edu>
19. 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>
20. Singh KM, Ahir VB, Tripathi AK, Ramani UV, Sajnani M, Koringa PG et al. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: a preliminary study. *Mol Biol Rep*. 2012;39:4841-4848. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1278-0>
21. Thoetkiattikul H, Mhuantong W, Laothanachareon T, Tangphatsornruang S, Pattarajinda V, Eurwilaichitr L, Champreda V. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Curr. Microbiol*. 2013;67(2):130-137. doi: 10.1007/s00284-013-0336-3
22. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-484. doi: 10.1038/nature07540

23. 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)

24. 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>

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. Weimer PJ. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front Microbiol.* 2015;6:296. doi: 10.3389/fmicb.2015.00296

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);

**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).

**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, 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)30-81-79, e-mail: [vita7456@yandex.ru](mailto:vita7456@yandex.ru)

**Кван Ольга Вилориевна**, кандидат биологических наук, и.о. заведующего 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.: 89225485657, e-mail: [kwan111@yandex.ru](mailto:kwan111@yandex.ru).

**Рахматуллин Шамиль Гафиулович**, 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](mailto:shahm2005@rambler.ru).

Поступила в редакцию 25 августа 2021 г.; принята после решения редколлегии 13 сентября 2021 г.; опубликована 30 сентября 2021 г. / Received: 25 August 2021; Accepted: 13 September 2021; Published: 30 September 2021