

На правах рукописи



Макаева Айна Маратовна

Влияние минеральных кормовых добавок на обмен веществ, микробиом рубца и продуктивность молодняка крупного рогатого скота

06.02.08 Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Оренбург - 2020

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»

Научный руководитель доктор биологических наук, доцент
Сизова Елена Анатольевна

Официальные оппоненты: **Герасименко Вадим Владимирович**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Оренбургский
государственный аграрный университет»,
кафедра химии, профессор

Овчинников Александр Александрович
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский
государственный аграрный университет»,
кафедра кормления, гигиены животных,
технологии производства и переработки
сельскохозяйственной продукции,
профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
научный центр животноводства – ВИЖ
имени академика Л.К. Эрнста»

Защита диссертации состоится 27 марта 2020 года в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.040.01 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» по адресу: 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» и на сайте: <http://www.fncbst.ru>, с авторефератом на сайтах <http://www.fncbst.ru> и <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Завьялов
Олег Александрович

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Микробиом рубца это открытая экосистема, позволяющая жвачным использовать растительные субстраты не доступные для других видов сельскохозяйственных животных. Микробиоценоз рубца тесно связан с продуктивностью (Jami E. et al, 2014) и здоровьем животных (Khafipour E. et al, 2009; Morgavi D.P. et al, 2013). Понимание важности микробиологических процессов в рубце жвачных для продуктивности предопределило особый интерес к проблеме. Научкой накоплен значительный экспериментальный материал о микробиоме рубца на фоне использования различных кормовых добавок, в том числе пробиотики (Long M. et al, 2014), органические кислоты (Nisbet D.J. et al, 2009) и др. Определенный интерес представляют исследования по использованию минеральных добавок для коррекции и управления составом микрофлоры рубца жвачных (Faulkner M.J. et al, 2017). Это во многом связано с эссенциальностью микроэлементов для микрофлоры рубца. Показано, что микроэлементы являются критическими компонентами рациона по влиянию на целлюлозолитическую активность микроорганизмов (Chamberlain C.C. et al, 1962; Kišidayová S. et al, 2018).

С недавнего прошлого исследования по оценке воздействия кормовых добавок на микробиом животных расширились с анализом влияния высокодисперсных веществ как перспективных источников микроэлементов (Yausheva E. et al, 2016; 2018).

Степень научной разработанности темы. Высокодисперсные препараты микроэлементов (ВДЧ) получают все более широкое применение в животноводстве (Fisinin V.I. et al, 2018). Это определяется неординарными биологическими свойствами ВДЧ - способностью проникать в ткани и органы, высокой площадью поверхности и др. (Silva G.A., 2008; Dominguez A. et al, 2014).

Одним из перспективных направлений использования ВДЧ как в постэмбриональный (Miroshnikova E. et al, 2015), так и в эмбриональный период развития животных (Sawosz F. et al, 2012) является использование в качестве источников микроэлементов. Это определяется относительно меньшей токсичностью (Zhang J., 2009; Zhang X.D. et al, 2011), более высокой биодоступностью элементов из препаратов ВДЧ (Tang H.Q. et al, 2016), что снижает нагрузку на окружающую среду (Aguila E.M., 2017) и позволяет производить продукцию, обогащенную минеральными веществами (Ungvári É., 2014).

В настоящее время применение ВДЧ микроэлементов апробировано на многих видах животных: цыплятах-бройлерах (Briens M., 2013; Сизова Е.А. и др., 2018), рыбах (Аринжанов А.Е., и др., 2013; Miroshnikova E. et al., 2015), норках (Wu X., 2014), лошадях (Gordon M.E., 2013), свиньях (Bikker P., 2012), овцах (Xun W., 2012) и др. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах использования ВДЧ в животноводстве (Мирошников С.А., Сизова Е.А., 2017). Между тем остается не изученным целый ряд вопросов,

связанных с влиянием ВДЧ на микробиом и продуктивность животных, что не позволяет широко использовать препараты этого класса в питании жвачных.

Цель и задачи исследований. Целью исследований, которые выполнялись в соответствии с программой ФНИ государственных академий наук на 2013-2020 годы (№ 0761-2019-0005), являлось изучение действия высокодисперсных препаратов на рубцовое пищеварение, состав микробиома рубца, обмен веществ и продуктивность молодняка крупного рогатого скота.

В соответствии с поставленной целью, в задачи исследований входило:

1. Изучить физико-химические характеристики высокодисперсных препаратов (SiO_2 , FeCo , CuZn , Cr_2O_3).

2. Дать сравнительную биологическую оценку высокодисперсным препаратам на модели *Echerichia coli K12 TGI*, изучить влияние препаратов на переваримость корма *in vitro* и *in situ*.

3. Изучить особенности рубцового пищеварения при использовании в питании высокодисперсных препаратов.

4. Изучить микробиом рубцового содержимого при поступлении с кормом высокодисперсных препаратов микроэлементов.

5. Изучить особенности минерального обмена в рубце при поступлении высокодисперсных препаратов микроэлементов.

6. Определить влияние опытных кормовых добавок на переваримость и обмен веществ в организме крупного рогатого скота.

7. Определить экономическую эффективность использования препаратов ВДЧ в питании молодняка крупного рогатого скота.

Научная новизна. Впервые дана комплексная оценка использования в питании крупного рогатого скота высокодисперсных препаратов SiO_2 , FeCo . Изучена переваримость корма, обмен веществ, продуктивность молодняка крупного рогатого скота при скармливании ВДЧ.

Впервые изучен таксономический состав микробиома рубца жвачных на фоне поступления высокодисперсных частиц. Выявлен факт нарастания числа бактерий в рубце, относящихся к филуму *Firmicutes* до 47,64% при использовании ВДЧ FeCo . В эксперименте описана смена доминирующих семейств, выражающаяся увеличением *Streptococcaceae* в 2,07 раза и уменьшением доли *Prevotellaceae* в 1,29 раза при скармливании ВДЧ SiO_2 . Определено увеличение численности доминирующего вида рубца жвачных – *Streptococcus bovis* при скармливании ВДЧ FeCo или SiO_2 .

Впервые, описан неординарный факт увеличения бактериальной биомассы при использовании в кормлении животных высокодисперсных частиц диоксида кремния.

Получены новые данные о влиянии препаратов ВДЧ SiO_2 и FeCo на обмен 19 эссенциальных, условно-эссенциальных и шести токсических химических элементов в рубце. Описан факт напряжения обмена в рубцовой жидкости хрома, железа, ванадия, ряда других химических элементов на фоне присутствия в рационе ВДЧ.

Впервые предложен способ повышения переваримости компонентов корма жвачными животными, через использование высокодисперсных частиц сплава FeCo (RU 2692662).

Теоретическая значимость работы состоит в разработке гипотезы формирования ответа организма жвачных на поступление из вне высокодисперсных форм микроэлементов, выражающегося в том числе в изменении микробиома рубца, повышении целлюлозо- и амилолитической активности рубцового содержимого, направленности биохимических процессов в рубце, изменении соотношения микроэлементов и снижении уровня токсичных элементов в рубцовой жидкости и как совокупный результат повышение интенсивности роста и развития молодняка крупного рогатого скота.

Практическая значимость работы. Практическая ценность исследования заключается в том, что полученные данные могут быть использованы при разработке систем кормления молодняка крупного рогатого скота и оптимизации процессов питания.

Применение препаратов высокодисперсных частиц диоксида кремния, сплава железа и кобальта в кормлении молодняка крупного рогатого скота позволит повысить эффективность использования энергии и протеина корма, увеличит рентабельность выращивания животных на 2,2 -2,4%.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленной цели и решения задач использовались стандартные зоотехнические, биохимические и физиологические методы исследования с использованием современного оборудования.

Полученный результат обработан с применением общепринятых методик при помощи программного пакета «Statistica 10.0».

Положения, выносимые на защиту:

Включение высокодисперсных препаратов SiO₂, сплава FeCo в рацион молодняка крупного рогатого скота сопровождается изменениями в микробиоме рубца, ферментативной активности и элементном составе рубцового содержимого.

Скармливание высокодисперсных препаратов SiO₂, сплава FeCo позволяет повысить эффективность использования питательных веществ корма, увеличить продуктивность и рентабельность прироста живой массы крупного рогатого скота.

Степень достоверности и апробации работы. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы фактическими данными. Подготовка, биометрический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа. Основные положения работы доложены и обсуждены на заседании научных сотрудников и специалистов отдела кормления сельскохозяйственных животных имени профессора С.Г. Леушина ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» (Оренбург, 2017, 2018, 2019).

Публикация материалов исследований. Основные результаты, выводы и рекомендации диссертационного исследования представлены в 10 научных работах, из них 2 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 3 в изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, получен 1 патент Российской Федерации на изобретение.

Реализация результатов исследований. Результаты исследований внедрены в производство в учебно-опытное хозяйство «Покровский сельскохозяйственный колледж-филиал» ФГБОУ ВО «Оренбургский ГАУ».

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 127 страницах компьютерной верстки, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследований, глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, предложений производству. Содержит 30 таблиц, 15 рисунков. Список использованной литературы включает 231 источник, в том числе 118 зарубежных авторов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены в период с 2015 по 2019 гг. в отделе кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. профессора С.Г. Леушина ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» (ФНЦ БСТ РАН). Для проведения исследований была использована база Центра коллективного пользования и центра «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» ФНЦ БСТ РАН, а также производственного участка «Покровский сельскохозяйственный колледж-филиал» ФГБОУ ВО «Оренбургский ГАУ».

Исследования выполнены в три этапа. На первом была проведена серия экспериментов по оценке биологической активности и выбору перспективных для применения в питании животных препаратов высокодисперсных частиц (ВДЧ) *in vitro*. На втором этапе проводилось определение переваримости питательных веществ кормов методом *in situ* и дана физиологическая оценка использованных препаратов ВДЧ. На заключительном этапе проведен научно-хозяйственный опыт (рисунок 1).

В экспериментальных исследованиях в качестве минеральной кормовой добавки были использованы высокодисперсные частицы SiO_2 , Cr_2O_3 , FeCo , CuZn , изготовленные ООО «Передовые порошковые технологии» (г. Томск), ФГБОУ ВПО «КНИТУ», ЦКП (г. Казань), ООО «Платина» (г. Москва) и Институтом физики металлов имени М.Н. Михеева УрО РАН (г. Екатеринбург).

Определение морфометрических параметров в полученных образцах проводилось методом атомно-силовой микроскопии в контактном режиме с использованием сканирующего зондового микроскопа Сертус Лайт V, (Россия).

На первом этапе исследований дана биологическая оценка высокодисперсных частиц как перспективным кормовым добавкам. В качестве объекта использован генноинженерный люминесцирующий штамм

Echerichia coli K12 TG1, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм».

Первая серия экспериментов *in vitro* была направлена на решение задач по оценке биологической активности ВДЧ (SiO_2 , Cr_2O_3 , FeCo , CuZn), в тесте ингибирования бактериальной люминесценции и подтверждение отсутствия токсичности дозировок, выбранных для тестирования на животных в тесте ингибирования бактериальной люминесценции.

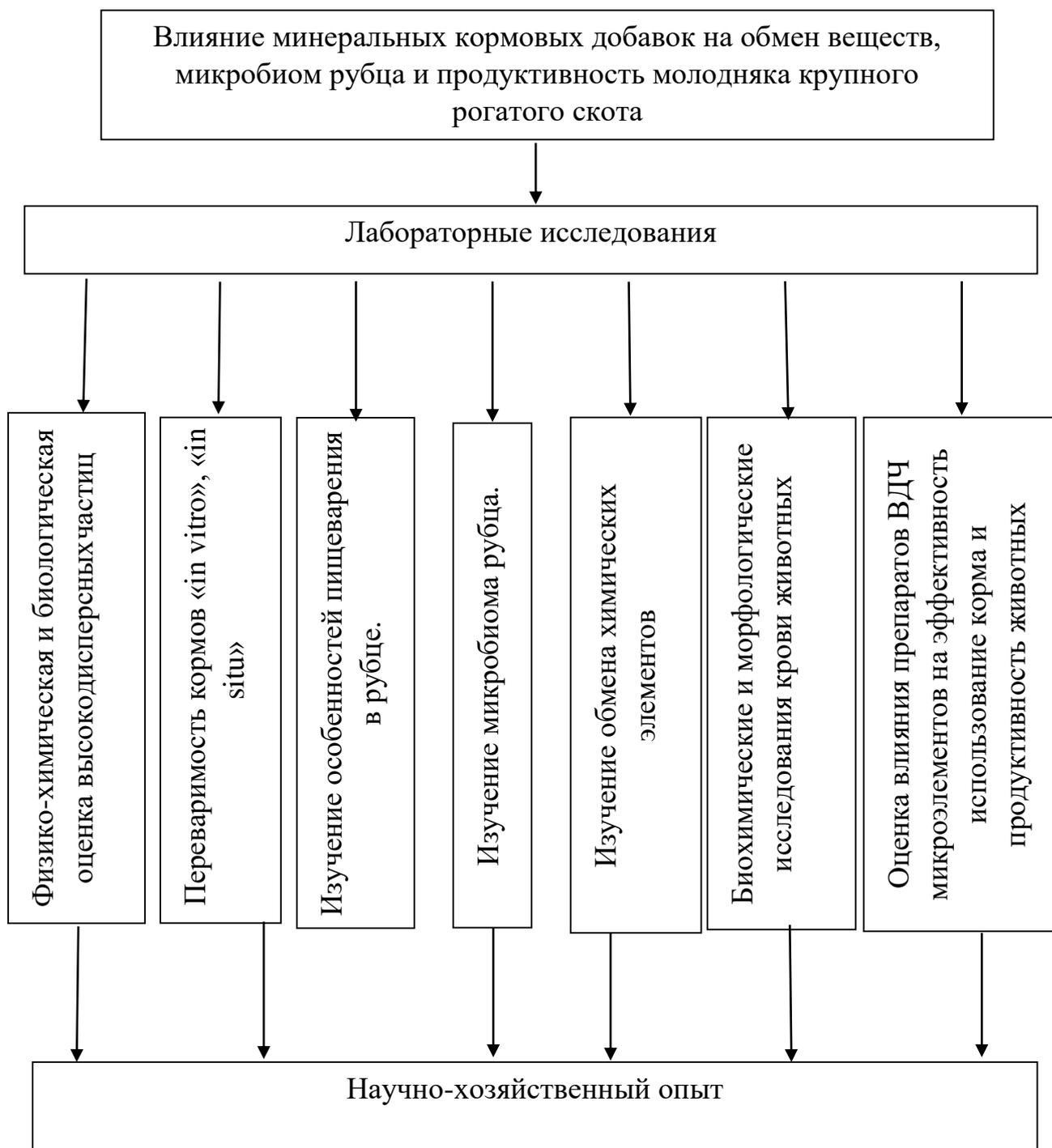


Рисунок 1 – Схема исследований

Вторая серия экспериментов была направлена на исследование продуктивного действия и физиологических особенностей животных при использовании ВДЧ.

Результаты исследований *in vitro*, полученные на начальном этапе использованы при планировании экспериментов на рубцовой жидкости крупного рогатого скота в ходе последующих экспериментов. В основе методики исследований использован принцип моделирования процессов пищеварения жвачных животных в условиях *in vitro* при помощи «искусственного рубца KPL 01». В качестве субстрата были использованы пшеничные отруби в натуральном виде.

Переваримость сухого вещества *in vitro* была установлена по методике доктора В. Лампетера в модификации Г.И. Левахина, А.Г. Мещерякова (2003) при помощи «искусственного рубца KPL 01».

На следующем этапе переваримость полученных кормовых добавок была установлена в исследованиях на крупном рогатом скоте. Эксперименты проводились на базе Покровского сельскохозяйственного колледжа-филиала ФГБОУ ВО «Оренбургский ГАУ». Молодняку крупного рогатого скота были установлены фистулы рубца.

Для проведения физиологического опыта методом пар аналогов было подобрано 9 бычков красной степной породы по живой массе, общему состоянию, породе и возрасту. В опыт включались бычки возраста 13 месяцев, средней живой массой 320-350 кг. Животные были случайным образом разделены на группы: на контрольную (К) и две опытные – I (SiO₂), II (FeCo).

В течение подготовительного периода (10 суток) бычки были переведены на привязное содержание, индивидуальное кормление (таблица 1).

Таблица 1 – Схема физиологического опыта

Группа Животных	Количество животных, гол	Продолжительность периода, суток		Характер кормления
		подготовительный	учетный	
Контрольная	3	10	5	ОР
I опытная	3	10	5	ОР+ВДЧ SiO ₂
II опытная	3	10	5	ОР+ВДЧ FeCo

Примечание: ОР – основной рацион; ВДЧ SiO₂ в дозировке - 13 мг/кг, ВДЧ FeCo в дозировке - 5 мг/кг.

Исследования на животных проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием лабораторных животных» (прил. к приказу Министерства здравоохранения СССР, от 12.08.1977 №755).

Переваримость питательных веществ была изучена в ходе балансовых опытов. Средние образцы кала (3 % от веса) и мочи были исследованы по методикам зоотехнического анализа (Лебедев П.Т., Усович А.Т., 1976) в независимом аккредитованном Испытательном центреФНЦ БСТ РАН на содержание в них сухого вещества, сырого протеина (ГОСТ 13496.4-93),

сырого жира (ГОСТ 13496.15-97), сырой клетчатки (ГОСТ 12396.2-91), сырой золы (ГОСТ 26226-95). В пробах мочи (2% от веса) определяли удельный вес, содержание азота и минеральные вещества. По данным ежедневного учета массы кала и его состава рассчитывали потерю веществ, за вычетом которых находились усвоенное количество корма.

Анализ элементного состава кормов и биосубстратов животных включал определение 25 химических элементов: Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, As, Cr, K, Na, P, Zn, I, V, Co, Se, Ti, Al, Be, Cd, Pb, Hg, Sn, Sr. Оценка элементного состава рубцовой жидкости животных производилось в лаборатории АНО «Центр биотической медицины», г. Москва (аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.22ПЯ05) методом атомно-эмиссионной и масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой (Optima 2000 V, Elan 9000, «PerkinElmer» США).

Для оценки микробных сообществ рубца крупного рогатого скота проводили отбор рубцовой жидкости. Для этого у фистульных животных брались пробы рубцового содержимого в количестве 300 мл до кормления, через 3 после начала кормления. Пробы помещали в стерильные микропробирки типа «эппендорф» (NuovaAptaca S.R.L., Италия), замораживали при -70°C (криоморозильник ULUF65 «ARCTICO», Дания) и хранили, не допуская повторного замораживания. Подготовка библиотек ДНК, а также секвенирование проводилось в Центре коллективного пользования «Персистентность микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург, Россия). Библиотеки ДНК 16S были подготовлены в соответствии с рабочим процессом Illumina (http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с праймерами, нацеленными на V3 и V4-области гена рРНК SSU, такого как прямой SD-Bact-0341-bS-17 и обратный SD-Bact-0785-aA-21 (Klindworth A. et al., 2013). Библиотеки были секвенированы в MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq v3 с 2×300 пар оснований. Анализ данных проводился с использованием USEARCH v8.0.1623_win32 (Edgar R.S., 2010) и включал слияние парных чтений, фильтрацию качества и выбор размера ампликона (минимальный размер 415 пар оснований). Была проведена таксономическая классификация последовательностей с использованием VAMPS и справочной базы SILVA (Huse S.M., 2014). Кривые разрежения были рассчитаны для OTU с эволюционным расстоянием 0,03 с использованием VAMPS, а также для визуализации таксономии OTU.

С целью изучения особенностей рубцового пищеварения проводили исследование состава рубцовой жидкости. Для этого у фистульных животных брались пробы рубцового содержимого в количестве 300 мл до кормления, через 3 и 6 часов после начала кормления. Пробы фильтровали через 4 слоя марли, в жидкой её части определяли концентрацию водородных ионов (рН) ионометром рН-150МИ. Подсчёт инфузорий проводился микроскопическим методом в счётной камере Горяева. Микробная масса рассчитывалась методом дифференцированного центрифугирования с последующим

высушиванием. Этот метод основан на различиях в скорости седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью.

Общий и остаточный азот определяли методом Кьельдаля, белковый - расчётным путём по разности общего и остаточного азота, аммиак - микродиффузным методом в чашках Конвея. Общее количество летучих жирных кислот определяли на хроматографе Кристалл ЛЮКС 4000.

Целлюлозолитическую активность оценивали по В.И. Георгиевскому. Методика определения амилолитической активности базируется на принципе расщепления крахмала микробной амилазой, с фиксацией процессов на фотоэлектроколориметре (СФ-2000).

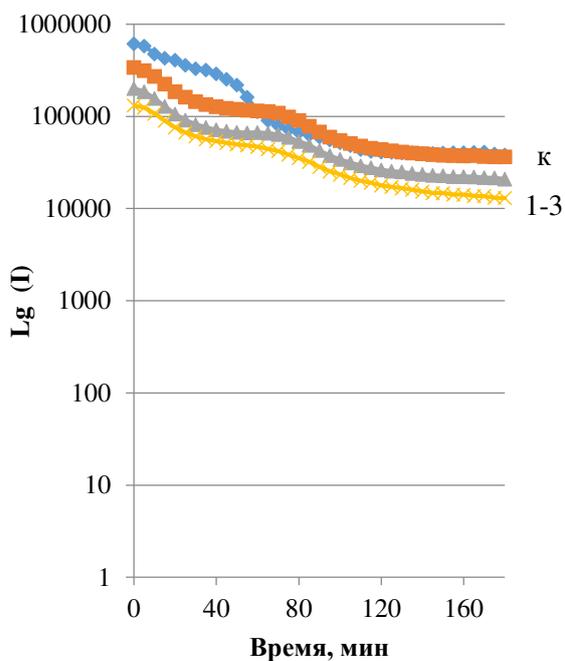
Морфологический состав крови изучали с использованием автоматического гематологического анализатора крови URIT 2900 VET Plus (производитель - URIT MEDICAL ELECTRONIC CO., LTD, Китай); биохимический состав с использованием автоматического биохимического анализатора CS-T240 (производитель – «Dirui Industrial Co., Ltd.», Китай). Биохимический анализ проводился с использованием коммерческих биохимических наборов для ветеринарии ДиаВетТест (Россия). Определение активности супероксиддисмутазы, каталазы и малонового диальдегида проводилось спектрофотометрическим методом на Stat fax 1904 Plus.

По завершению физиологических исследований был спланирован и проведен научно-хозяйственный опыт, в ходе которого была дана продуктивная и экономическая оценка оцениваемых кормовых добавок. Экономическая эффективность использования оцениваемых кормовых добавок рассчитывалась на основании сложившихся затрат на выращивание и содержания животных в основной учетный период.

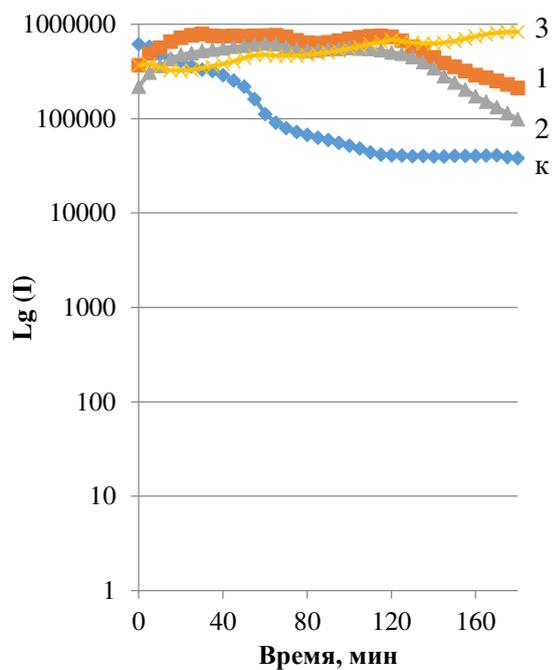
Результаты, полученные в исследованиях, были обработаны с применением общепринятых методик при помощи приложения «Excel 2010» и «Statistica 10.0», включая определение средней арифметической величины (M), стандартной ошибки средней (m).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биологическая оценка высокодисперсных частиц. Рубцовая жидкость и серия ее разведений характеризовались отсутствием токсического действия в отношении клеток бактерий. При этом была отмечена индукция свечения клеток *Echerichia coli K12 TG1*, которая развивалась в первые 20 минут контакта и наблюдалась на протяжении всего эксперимента. При этом наиболее показательной является биологическая реакция на ВДЧ SiO₂, как наименее инертные (рисунок 2).

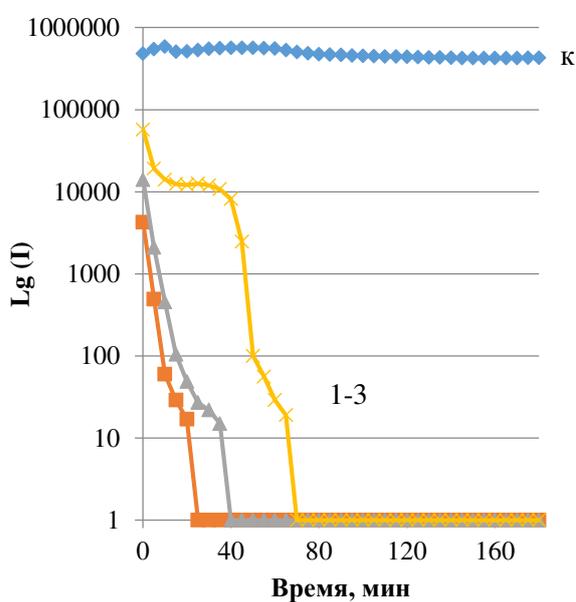


а)

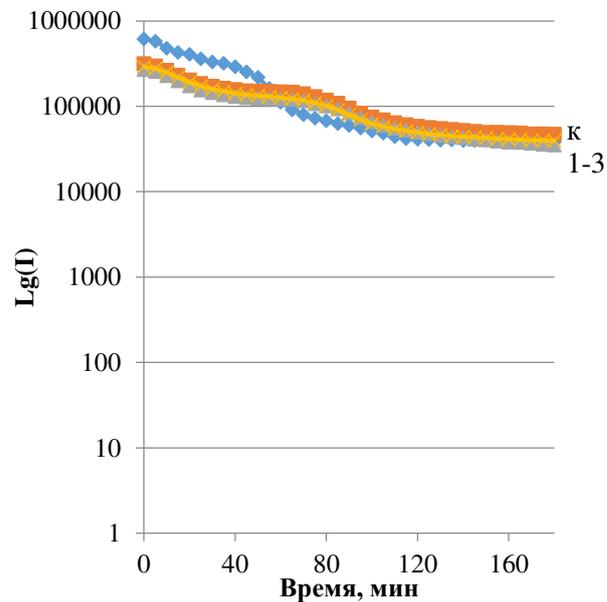


б)

Рисунок 2 – Динамика свечения *E.coli K12 TG1* с клонированными luxCDABE-генами *P.leiognathi 54D10* при контакте с ВДЧ SiO₂ (а) в концентрациях: 0,1 (1), 0,25 (2) и 2 (3) мг/мл и смесью рубцовая жидкость + ВДЧ SiO₂ (б), в концентрациях: 0,1 (1), 0,25 (2) и 2 (3) мг/мл; к - контроль.



а)



б)

Рисунок 3 – Динамика свечения *E.coli K12 TG1* с клонированными luxCDABE-генами *P.leiognathi 54D10* при контакте с ВДЧ CuZn (а) в концентрациях: 0,75 (1), 0,35 (2) и 0,25 (3) мг/мл и смесью рубцовая жидкость + ВДЧ CuZn (б), в концентрациях: 0,75 (1), 0,35 (2) и 0,25 (3) мг/мл; к - контроль.

Из полученных данных следует, что протестированные препараты ВДЧ в выбранном диапазоне концентраций не оказывают токсического действия на клетки бактерий и могут быть использованы в дальнейшей серии экспериментов. Исключение составляют ВДЧ CuZn, проявляющие остро токсичное действие (рисунок 3). Однако нивелирование токсичности ВДЧ CuZn компонентами рубцовой жидкости также позволяет оставить их в схеме исследования.

Оценка переваримости сухого вещества корма *in vitro* и *in situ*. Как следует из полученных результатов введение в состав корма ВДЧ SiO₂ в дозировке 0,1 мг/мл сопровождалось увеличением переваримости сухого вещества на величину до 11 %. Последующее увеличение концентрации ВДЧ не позволило увеличить переваримость, фактический рост данного показателя составил 12 – 12,9 % (P≤0,01).

Введение в состав корма ВДЧ Cr₂O₃ в дозировке 0,25 мг/мл не отразилось на переваримости сухого вещества. Однако, по мере увеличения концентрации отмечалось достоверное снижение значений переваримости. При внесении ВДЧ FeCo в концентрациях от 0,25 до 0,75 мг/мл отмечалось повышение переваримости на 0,3 - 2,4 %. Напротив, использование ВДЧ CuZn во всех оцениваемых дозировках сопровождалось снижением переваримости сухого вещества корма.

При добавлении в корм максимальной дозировки ВДЧ FeCo переваримость *in situ* через 3 часа достоверно увеличивается на 2,9 % (P≤0,01) относительно контроля. Аналогичное повышение переваримости сухого вещества при введении максимальной дозировки ВДЧ SiO₂ составило 2,5 % (P≤0,01). На основании полученных данных нами были выбраны оптимальные дозировки для дальнейшего исследования на молодняке крупного рогатого скота: ВДЧ FeCo - 5 мг/кг и ВДЧ SiO₂ - 13 мг/кг, которые рассчитаны посредством пересчета на живой вес животных.

Результаты физиологических исследований на молодняке крупного рогатого скота.

В период проведения физиологического опыта животные контрольной и опытных групп содержались в одинаковых условиях. Животных содержали и кормили внутри типового помещения, приспособленного для привязного содержания, имеющего стационарные кормушки и автопоилки. Кормление осуществлялось сбалансированным рационом в состав которого входило 2,5 кг сена суданки, 3,0 кг люцернового сена, 5 кг кукурузного силоса, 0,5 кг жмыха, 25 г премикса, 1 кг пшеничных отрубей. Различия состояли в том, что животные I опытной группы дополнительно к основному рациону получали ВДЧ SiO₂ в дозировке 13 мг/кг, II опытной ВДЧ FeCo в дозе 5 мг/кг.

Характеристика рубцового пищеварения. Введение ВДЧ в корм молодняке крупного рогатого скота сопровождалось изменениями показателей рубцового пищеварения. Как следует из результатов наших исследований колебания концентрации водородных ионов в рубце подопытных животных находились в пределах 6,64-7,01 рН. Сдвиг рН в слабокислую сторону сопровождалось увеличением содержания летучих

жирных кислот, так после 3-х часов переваривания во I и II опытных группах концентрация ЛЖК увеличилась на 10,4% и 1,3% относительно контроля. По истечению 6-ти часов происходит повышение уровня ЛЖК во II опытной группе на 23,5% по отношению к контролю.

Величина pH среды во многом определяет всасываемость аммиака в преджелудках. Аммиак из щелочной среды активно всасывается в кровь, тогда как из кислой, ввиду образования аммония процесс значительно замедляется.

Часть азота, поступившего с кормом, преобразуется в аммиак, поэтому по концентрации аммиака можно судить об обмене азота. В наших исследованиях установлен факт нарастания концентрации аммиака в рубцовом содержимом I и II опытных группах на величину до 6,1% и 12,6% после 3 часов введения, соответственно. Это наблюдается и при 6-ти часовой экспозиции, показатели аммиака в содержимом рубца животных I опытной группы превысила уровень контроля на 3,7%, во II опытной группе на 9,3%.

Микробиом рубца и его характеристики. В ходе исследований установлено, что более 99% микробиома рубца представлено филумом *Bacteria*. При этом доминирующими филумами являлись *Bacteroidete* и *Firmicutes*. Основными классами бактерий, были *Bacteroidia* и *Sphingobacteria*. Среди семейств, которые удалось классифицировать, выделялись *Prevotellaceae*, *Streptococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Bacteroidaceae*. При оценке родового разнообразия было выявлено 6 родов, численность которых превышала 3,5%. Однако при идентификации рубцового содержимого на уровне вида происходит полное превалирование *Streptococcusbovis* численность которого составила 8,52% от общего числа видового разнообразия микрофлоры рубца.

При введении в рацион животных ВДЧ FeCo доминирующим остался таксон *Bacteria* (99,96% от общего числа), но классифицированы были 25 филумов, из которых доминирующее положение также занимали *Bacteroidetes* (39,02%) и *Firmicutes* (47,64%), при этом если в контроле достоверных различий выявлено не было, то при добавлении ВДЧ происходило нарастание числа бактерий, относящихся к филуму *Firmicutes*. В то время как численность филума *Proteobacteria* не имела тенденции к изменению и составила всего 4,52%, что практически идентично его содержанию в контроле. Таксон *Bacteroidetes* был представлен в большей степени классом *Bacteroidia*, занимающим 32,86% от общей численности бактериальных сообществ и больше половины всей численности данного таксона, класс же *Sphingobacteria* был значительно менее многочисленным и составлял 4,24% от общего числа выявленных бактерий. Таксон же *Firmicutes* был представлен в большинстве двумя классами – *Clostridia* и *Bacilli*, численность которых составила 27,04 и 13,71% соответственно. Был выявлен 41 класс, значимыми из которых оказались только четыре, представленные выше классы включали бактерии, численность которых была выше 3,5% (рисунок 4).

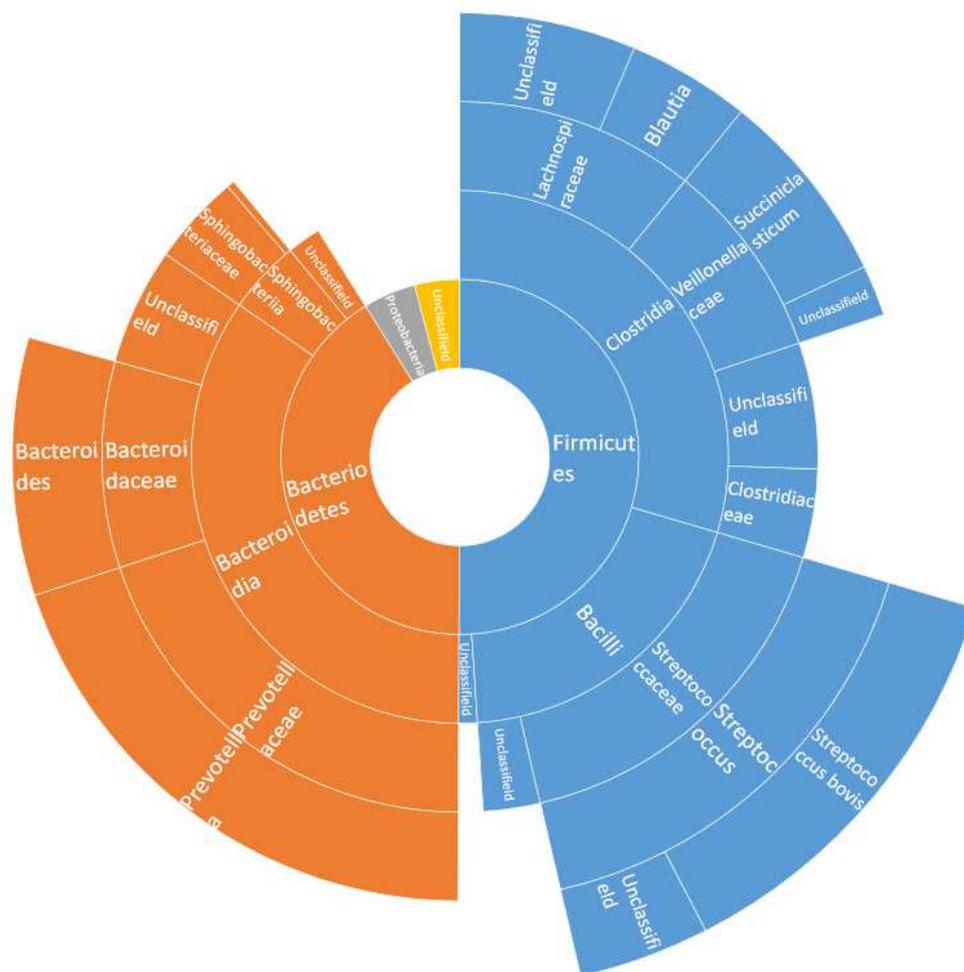


Рисунок 4 – Метагеномный анализ рубцовой жидкости крупного рогатого скота при внесении в рацион ВДЧ FeCo

В рубце животных, получавших ВДЧ SiO₂, 99,97% от общего числа выделенных таксономических групп занимал таксон *Bacteria*, среди которого наиболее значимым филумом выступал *Firmicutes*, занимающий более 50% от общего числа выделенных таксонов. Таксон *Firmicutes* был охарактеризован двумя классами – *Clostridia* и *Bacilli*, однако если численность класса *Clostridia* не имела достоверных отличий от контрольных значений, то численность класса *Bacilli* претерпела существенные изменения в ответ на добавление в рацион подопытных животных ультрадисперсных частиц SiO₂ и повысилась до 25,2%, что в 1,83 раза выше по отношению к контролю. Таксон же *Bacteroidetes* в основном был представлен одним классом *Bacteroidia*, численность которого снижалась на 8,64% по сравнению с контролем и на 6,16% по сравнению со II опытной группой и составила 26,70% от общего числа. В другом классе, представленном таксоном *Sphingobacteriia*, численность изменялась в пределах 1% от их количества в контрольной группе. Остальные идентифицированные классы характеризовались численностью, не превышающей 3,5%.

Введение в рацион высокодисперсных частиц SiO₂ приводило к смене доминирующего семейства, что результировалось в достоверном увеличении

Влияние ВДЧ на минеральный обмен в рубце подопытных животных. Анализ элементного состава рубцовой жидкости выявил различия в механизмах действия препаратов ВДЧ на обмен химических веществ. Так, через три часа после поступления ВДЧ SiO₂ наблюдалось снижение железа в рубцовой жидкости на 5,5 % (P≤0,01) при повышении меди на 42,4 %, кальция на 31,8 %, марганца на 29,6 % и др. (рисунок 6 А). Поступление ВДЧ FeCo сопровождалось уменьшением концентрации кобальта на 40 %, железа на 46 % (P≤0,01), хрома на 47 % (P≤0,05) относительно контрольной группы (рисунок 6 В).

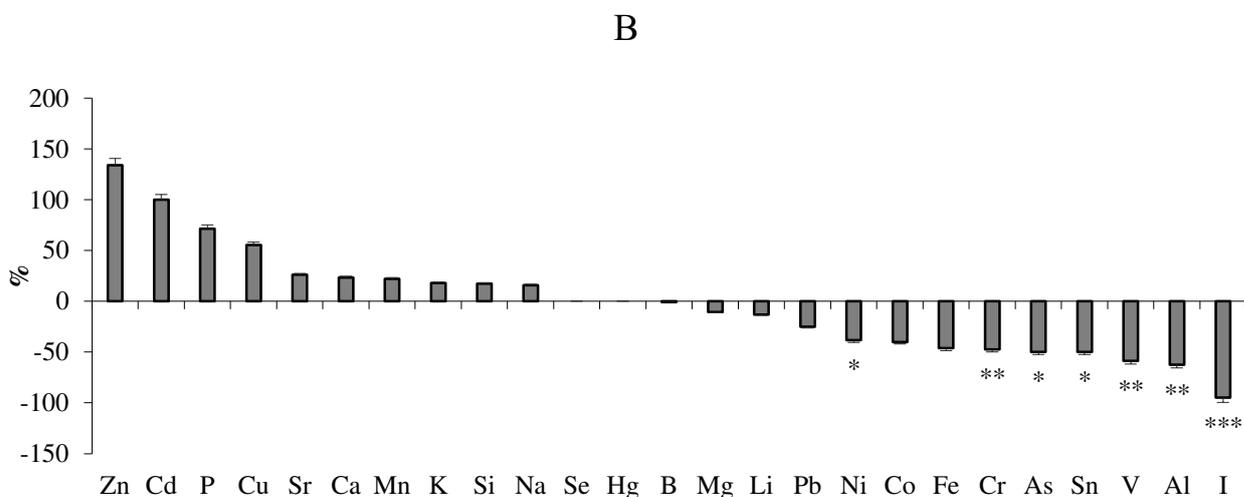
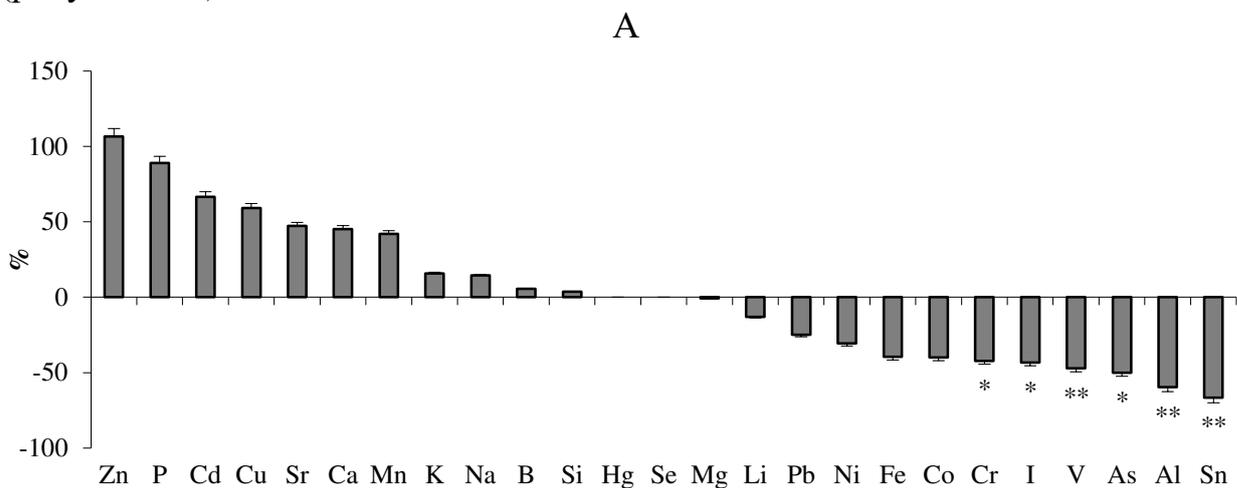


Рисунок 6 – Разница концентраций химических элементов в рубцовой жидкости опытных групп по сравнению с контрольной через 3 часа после введения: А - ВДЧ SiO₂ (I опытная группа); В - ВДЧ FeCo (II опытная группа), %.

Анализ содержания токсических химических элементов в рубцовой жидкости через 3 часа после кормления ВДЧ SiO₂ показал, что наблюдалось снижения алюминия на 60 % (P≤0,05) относительно контроля. Через 6 часов после введения ВДЧ SiO₂ наблюдалось увеличение концентрации кремния на 31 %, мышьяка на 40 %, никеля на 25,8 %, бария на 12,6 % в сравнении с контрольной группой (рисунок 7 А). Противоположенный эффект дало

поступление в рубец ВДЧ FeCo, при котором снижалась концентрация мышьяка на 60 %, никеля на 45,1 % и ванадия на 60 % ($P \leq 0,01$) по сравнению с контролем (рисунок 7 В).

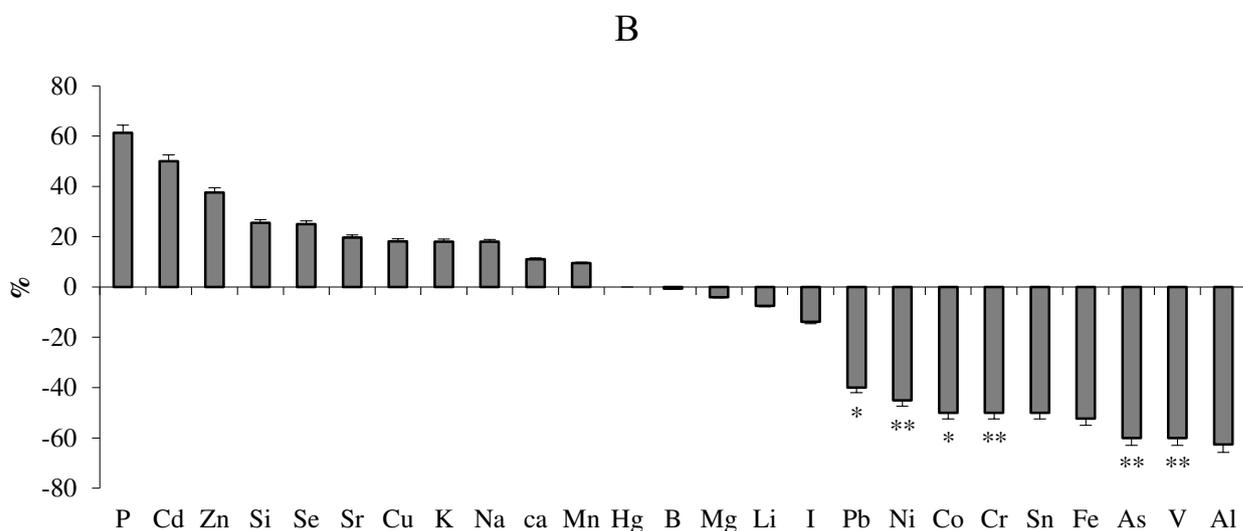
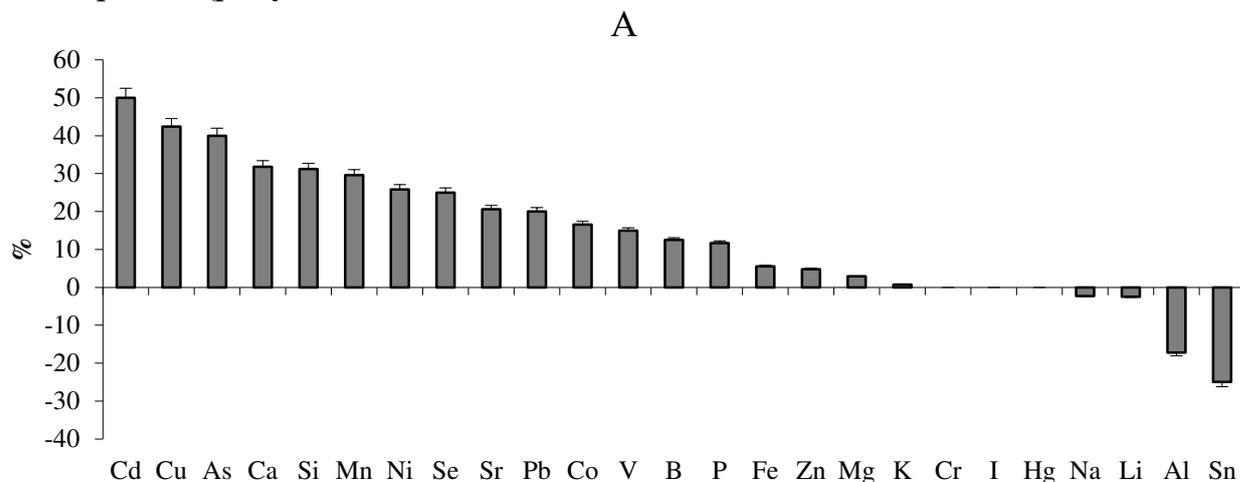


Рисунок 7 – Разница концентраций химических элементов в рубцовой жидкости опытных групп по сравнению с контрольной через 6 часов после введения: А – ВДЧ SiO₂ (I опытная группа); В - ВДЧ FeCo (II опытная группа), %.

Морфо-биохимические показатели крови. Концентрация гемоглобина после введения ВДЧ FeCo была достоверно увеличена относительно контрольной на 6 % ($P \leq 0,05$) и на 5,5 % в I опытной группе. Относительное содержание моноцитов во II опытной группе увеличилось на 5,6 ($P \leq 0,05$) в сравнении с контролем, а в I наоборот произошло снижение по отношению к контролю. Содержание тромбоцитов при введении ВДЧ снизилось на 17,7 % ($P \leq 0,05$) в I опытной и на 21,7 % ($P \leq 0,05$) во II относительно контроля.

Проведенные исследования показали, что биохимический состав крови животных во всех группах находился в пределах допустимых

физиологических норм, введение ВДЧ приводило к недостоверному росту таких показателей как, АЛат, АСаТ, кальций, фосфор, мочеви́на и др.

Анализ содержания сывороточного железа I опытной группы показал увеличение на 32,5 % ($P \leq 0,05$), во II опытной группе на 21,2 % ($P \leq 0,05$) в сравнении с контролем. Динамика содержания моче́вой кислоты характеризовалась повышением её количества во II группе на 3,67 %, и снижением в I группе относительно контроля.

Переваримость корма и эффективность использования питательных веществ рационов. Исследования влияния высокодисперсных препаратов SiO_2 и FeCo на переваримость питательных веществ, выявили ряд различий в эффективности использования корма. Так, переваримость сухого вещества была увеличена в I опытной группе на 1,76 % ($P \leq 0,001$), во II на 0,56 % относительно контроля. Аналогичные изменения коэффициента переваримости органического вещества представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Коэффициенты переваримости питательных веществ рационов у подопытных животных, %

Показатель	Группа		
	I опытная	II опытная	контрольная
Сухое вещество	65,73±0,17**	64,53±0,27	63,97±0,08
Органическое вещество	68,57±0,18**	67,43±0,17*	66,83±0,17
Сырой протеин	64,57±0,02**	63,09±0,18**	61,80±0,15
Сырой жир	68,10±0,55	70,64±0,02**	67,73±0,46
Сырая клетчатка	54,49±0,24**	53,67±0,08**	51,80±0,10
БЭВ	73,30±0,70	74,70±0,11**	71,70±0,06

Примечание: * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$.

Значения переваримости сырого протеина увеличились в I и II опытных группах на 2,7 % ($P \leq 0,01$) и 1,3 % ($P \leq 0,01$) соответственно. Переваримость сырого жира в сравнении с контролем оказалась выше во II опытной группе на 2,9 % ($P \leq 0,01$). Коэффициент переваримости сырой клетчатки повышался в I и II опытных группах на 2,7 % ($P \leq 0,01$) и 1,87 % ($P \leq 0,01$). Аналогичное повышение переваримости отмечалось нами и для безазотистых экстрактивных веществ.

Обмен энергии и азота в организме подопытных животных. Наиболее значительное поступление в организм животных переваримой энергии отмечалось в I и II опытных группах на 2,9 % ($P \leq 0,01$) и на 3,1 % ($P \leq 0,01$) превышающие контроль.

Поступление обменной энергии с кормом в I и II опытных группах увеличено до 71,72 и 61,62 МДж/гол ($P \leq 0,01$). Существенных изменений в остальных опытных группах не отмечалось.

Коэффициент продуктивного использования обменной энергии оказался наибольшим во II опытной группе – 0,325. Несколько меньшим данный показатель был в I опытной – 0,323 и наименьшим в контроле – 0,314.

На основании проведенных экспериментов нами было установлено, что у всех подопытных бычков баланс азота был положительным, с различной эффективностью использования этого вещества. Так, подопытные животные I и II опытных групп переваривали азот на 10,3 % ($P \leq 0,05$) и 13,1 % ($P \leq 0,01$) лучше, чем контрольные. В опытных группах мы отмечали более высокие коэффициенты использования азота от принятого 16,5 % ($P \leq 0,01$) и 15,4 % ($P \leq 0,01$) соответственно, превосходящих уровень контроля.

Результаты научно-хозяйственного опыта

Кормление и содержание подопытных животных. В период проведения научно-хозяйственного опыта кормление подопытных животных было аналогично физиологическим опытам, все рационы были сбалансированы по основным питательным веществам.

В ходе научно-хозяйственного опыта отмечалась незначительная разница между группами в поедаемости сена (люцернового, суданки), силоса кукурузного (3-6 %). В контрольной группе поедаемость сена люцернового составила 90 %, сена суданки – 92 %, силоса кукурузного – 90 %. В I опытной группе при введении в рацион ВДЧ SiO₂ поедаемость кормов составила 95-96,4 %, во II опытной 93,2-96 %.

Рост и развитие подопытного молодняка. В эксперименте показано ростостимулирующее действие опытных кормовых добавок (таблица 3).

Таблица 3 – Динамика живой массы подопытных животных, кг

Возраст, мес.	Группа		
	I опытная	II опытная	контрольная
13	322±2,26	324±1,44	318±2,05
14	353±2,27	353±1,79	347±2,12
15	384±2,28*	383±1,80*	375±2,13
16	413±2,29**	416±1,81**	402±2,13

Примечание: * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$

Как следует из полученных данных использование ВДЧ позволило увеличить живую массу опытного молодняка до 413 кг в I и 416 кг во II опытной группах это на 11 ($P \leq 0,01$) и 14 кг ($P \leq 0,01$) превосходило контроль.

Экономическая эффективность выращивания бычков. Применение высокодисперсных частиц в кормлении подопытных животных позволило повысить экономическую эффективность выращивания молодняка (таблица 4).

Таблица 4 – Экономическая эффективность выращивания молодняка

Показатель	Группа		
	I опытная	II опытная	контрольная
Абсолютный прирост, кг	91,1	92,9	83,5
Производственные затраты, руб./гол	8137,1	8311,5	7616,7
Себестоимость 1 ц. прироста	8932,1	8946,7	9121,8
Реализационная стоимость прироста, руб./кг	100	100	100
Реализационная стоимость прироста, руб./гол	9110	9290	8350
Прибыль, руб.	972,9	978,5	733,3
Уровень рентабельности, %	12,0	11,8	9,6

Высокая интенсивность роста животных I и II опытных групп при примерно одинаковых затратах, предопределила факт уменьшения себестоимости 1 ц прироста на 189,7 и 175,1 рублей на голову относительно контроля, соответственно.

Как следует из анализа полученных данных рентабельность выращивания молодняка I и II опытных групп была на 2,4 и 2,2 % выше аналогичного показателя, рассчитанного для контрольной группы.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Использованные в исследованиях ВДЧ Cr_2O_3 характеризовались гидродинамическим размером 103 ± 11 нм; SiO_2 $109,6 \pm 16,6$; $FeCo$ 265 ± 25 ; $CuZn$ 125 ± 75 нм, с содержанием действующего вещества 99,8-99,9%. Высокодисперсные частицы SiO_2 и $FeCo$, в выбранном диапазоне концентраций не оказывают токсического действия на нативную культуру *Echerichia coli K12 TG1* и смесь её с рубцовой жидкостью. ВДЧ Cr_2O_3 и $CuZn$ нетоксичны, только в комплексе с рубцовой жидкостью.

2. Введение ВДЧ $FeCo$ и SiO_2 не оказывает негативного воздействия на показатели переваримости кормового субстрата *in vitro*, *in situ*. Напротив, использование этих препаратов в дозировках 0,75 и 2 мкг/мл сопровождается повышением переваримости сухого вещества модельного корма *in vitro* и *in situ*.

3. Исследования по оценке биологической активности ВДЧ на модели рубца выявили изменения в биомассе бактерий при включении в корм ВДЧ SiO_2 , на 35,3%, через 3 часа после кормления и биомассы простейших на 5,5% через 6 часов после кормления.

4. Включение в рацион молодняка крупного рогатого скота оцениваемых кормовых добавок сопровождалось изменениями в микробиоме рубца. При использовании ВДЧ SiO_2 численность класса *Bacilli* повысилась в

1,83 раза, таксон *Bacteroidetes* в основном был представлен одним классом *Bacteroidia*, численность которого снижалась на 8,64%. Введение в рацион высокодисперсных частиц SiO_2 приводило к смене доминирующего семейства - увеличению встречаемости представителей семейства *Streptococcaceae* в 2,07 раза и уменьшении доли *Prevotellaceae* в 1,29 раза.

Внесение в рацион крупного рогатого скота ВДЧ FeCo сопровождалось увеличением численности доминирующего вида *Streptococcus bovis* на 7,46%, ВДЧ SiO_2 на 8,01% в сравнении с контролем.

5. Использование ВДЧ SiO_2 в питании молодняка крупного рогатого скота сопровождается повышением целлюлозолитической активности содержимого рубца на 2,8 % после 3, и на 3,6 % после 6 часов экспозиции. Аналогичный результат от использования ВДЧ FeCo составляет 2,2%. Исследования по амилолитической активности рубцовой жидкости, показали, что использование ВДЧ стимулирует активность рубцовой жидкости на 7,4 и 6,6% через 3, и на 5,0 и 5,4 % через 6 часов после кормления.

6. Анализ биохимических характеристик рубцового пищеварения подопытных животных показал, что концентрация ЛЖК достигает максимального значения при введении ВДЧ SiO_2 . Показатель рН достигал своего минимума через 6 часов после кормления у животных, получавших ВДЧ FeCo.

7. Использование в кормлении молодняка крупного рогатого скота ВДЧ SiO_2 и FeCo сопровождается изменением обмена химических элементов в рубце. Причем в период первых трех часов действие оцениваемых препаратов оказалось одинаковым и выражалось в снижении концентрации в рубцовой жидкости хрома на 73-90%, железа на 65-85%, мышьяка на 50,0 %, ванадия на 88,9- 240%, алюминия в 2,5 - 2,7 раза, олова в 2-3 раза на фоне повышения концентрации фосфора на 72-89 % и цинка в 2,1 - 2,3 раза. Однако, по окончании шести часов пищеварения действие ВДЧ SiO_2 уже не распространялось на минеральный состав рубцовой жидкости, в то же время — это действие сохранилось для ВДЧ FeCo.

8. Морфологические и биохимические показатели крови подопытных животных находились в пределах физиологической нормы. Скармливание препарата ВДЧ SiO_2 сопровождаются увеличением концентрации в крови подопытных животных эритроцитов, лимфоцитов, гранулоциты, тромбоцитов. Введение в корм ВДЧ FeCo сопровождалось повышением уровень в крови лейкоцитов, моноцитов и гемоглобина.

9. Скармливание подопытным животным препаратов ВДЧ сопровождается повышением коэффициентов переваримости питательных веществ рационов. Таким образом, наиболее высокими показателями переваримости большинства питательных веществ обладали бычки, получавшие ВДЧ FeCo.

10. Использование в кормлении молодняка крупного рогатого скота препаратов ВДЧ SiO_2 и FeCo в дозировках 13 и 5 мг/кг позволяет повысить интенсивность роста животных на 9,1-9,9 %. Это обеспечивает

дополнительное увеличение рентабельности производства говядины на 2,2-2,4%.

5. ПРЕДЛОЖЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВУ

В целях повышения эффективности рубцового пищеварения и снижения затрат на производство прироста живой массы молодняка крупного рогатого скота целесообразно в питании животных использовать препараты высокодисперсных частиц диоксида кремния в дозировке 13 мг/кг или сплава железа и кобальта в дозировке 5 мг/кг живой массы. Это позволит повысить интенсивность роста животных на 9-10% и увеличить рентабельность производства говядины на 2-3%.

6. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Тема диссертационного исследования перспективна к дальнейшей разработке в части:

формирования новых подходов к управлению метаболизмом в организме сельскохозяйственных животных с использованием высокодисперсных препаратов металлов-микроэлементов;

исследований по оценке действия высокодисперсных препаратов по минеральному обмену жвачных на всех этапах метаболизма, с детализацией изменений в микробиоме преджелудков.

7. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки

1. Макаева А.М., Атландерова К.Н., Сизова Е.А., Мирошников С.А. Элементный и микрoэкологический состав рубца при использовании в кормлении крупного рогатого скота высокодисперсных частиц // Животноводство и кормопроизводство. – 2019. – Т. 102. – № 3. – С.19-32.

2. Макаева А.М., Сизова Е.А., Атландерова К.Н. Переваримость кормов и обмен веществ молодняка крупного рогатого скота при введении в рацион минеральных комплексов // Животноводство и кормопроизводство. – 2019. – Т. 102. – № 4. – С.83-94.

Статьи в изданиях, входящих в БД Scopus и Web of Science

3. Makaeva A., Atlanderova K., Miroshnikov S., Sizova E. Rumen microbiome of cattle after introduction of ultrafine particles in feed // FEBS Open Bio. – 2019. – № 9. – Suppl. 1. – P. 416. doi: 10.1002/2211-5463.12675

4. Makaeva A.M., Atlanderova K.N., Sizova E.A., Nechitaylo K.S. Elemental composition and ruminal digestion with nanosized forms of SiO₂, FeCo // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – № 341. – 012193. doi:10.1088/1755-1315/341/1/012193

5. Makaeva A.M., Aleshina E.S., Sizova E.A., Atlanderova K.N. Cattle' microbiocoenosis of rumen while various feed ultrafine particles release // IOP Conf.

Патент РФ

6. Мирошников С.А., Яушева Е.В., Сизова Е.А., Макаева А.М., Рогачев Б.Г. Способ повышения переваримости компонентов корма сельскохозяйственными животными // Патент РФ на изобретение RUS 2 692 662. Дата подачи заявки: 2018.07.26. Опубликовано: 25.06.2019. Бюл. № 18.

Публикации в других научных изданиях и в материалах научно-практических конференций

7. Макаева А.М., Атландерова К.Н., Бобиева А.А. Влияние ультрадисперсных препаратов микроэлементов на рубцовое пищеварение крупного рогатого скота // В сборнике: Нанотехнологии в сельском хозяйстве: перспективы и риски. Материалы международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 104-107.

8. Атландерова К.Н., Макаева А.М., Курилкина М.Я. Перспективы использования ультрадисперсных частиц в кормлении молодняка крупного рогатого скота // Нанотехнологии в сельском хозяйстве: перспективы и риски. Материалы междунар. науч.-практ. конф., (г. Оренбург, 26-27 сентября 2018 г.) / под общ. ред. гл.-корр. РАН С.А. Мирошникова – Оренбург: Изд-во ФНЦ БСТ РАН. – 2018. – С. 46-50, (РИНЦ).

9. Макаева А.М., Алешина Е.С., Сизова Е.А., Атландерова К.Н., Нечитайло К.С. Микробиоценоз рубца крупного рогатого скота при введении в корм различных высокодисперсных частиц // Фундаментальные основы технологического развития сельского хозяйства: материалы российской научно-практической конференции с международным участием. (г. Оренбург, 24-25 октября 2019 г.) / под общ. ред. чл.-корр. РАН С.А. Мирошникова – Оренбург: Изд-во ФНЦ БСТ РАН. – 2019. – 381 с. // С.262-265.

10. Макаева А.М., Атландерова К.Н. Исследование ультрадисперсных частиц сплава FeCo, CuZn на модели *in vitro* // Международная научно-практическая конференция, посвященная 90-летию ВИЖа «Научное обеспечение развития животноводства в Российской Федерации». – 2019. – 565 с. // С. 291-295.

Макаева Айна Маратовна

Влияние минеральных кормовых добавок на обмен веществ, микробиом рубца и продуктивность молодняка крупного рогатого скота

06.02.08 Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов

Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Подписано в печать 22.01.2020 г. Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ №2