

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И ИНТЕНСИВНОСТЬ МЕТАНООБРАЗОВАНИЯ В РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ *in vitro* ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ РАЦИОНОВ С ДОБАВКАМИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ И CoCl₂*

Е.В. ШЕЙДА^{1, 2} ✉, В.А. РЯЗАНОВ¹, Г.К. ДУСКАЕВ¹

Для получения экологически безопасной продукции при выращивании крупного рогатого скота необходимо включать в рационы животных биологически активные вещества, повышающие эффективность использования питательных компонентов корма. Некоторые из этих соединений применяются в качестве модификаторов функции рубца (чаще по отдельности, а не в комплексах). В настоящей работе впервые описаны изменения метаболических параметров в рубцовой жидкости бычков казахской белоголовой породы в тестах *in vitro* с образцами рациона, содержащими добавки фитопрепаратов и хлорида кобальта, определены их наиболее эффективные сочетания и дозировки. При использовании комплекса *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ) и CoCl₂ (1,5 мг/кг СВ) было установлено повышение переваримости сухого вещества, увеличение активности пищеварительных ферментов и содержания метаболитов в рубцовой жидкости, а также снижение образования метана. Использование комплекса *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) и CoCl₂ (1,5 мг/кг СВ) привело к максимальному снижению образования метана. Цель работы — изучить влияние растительных препаратов и хлорида кобальта отдельно и совместно на изменение метаболических параметров в рубцовой жидкости бычков методом *in vitro*. Опыты проводили в 2021 году в ЦКП БСТ РАН (г. Оренбург). У бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы ($N = 4$, средняя масса 250–265 кг, возраст 9–10 мес) через хроническую фистулу рубца отбирали пробы рубцовой жидкости (РЖ) спустя 12 ч после кормления. Для тестирования *in vitro* с РЖ были приготовлены I контрольный рацион, включавший 70 % грубых кормов (сено луговое разнотравное) и 30 % концентрированных кормов (ячмень дробленый), и пять опытных образцов, в состав которых входили дополнительные компоненты: II — CoCl₂ (1,5 мг/кг СВ; ООО «НПК «Асконт+», Россия), III — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ), IV — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ), V — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) + CoCl₂ (1,5 мг/кг СВ), VI — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ) + CoCl₂ (1,5 мг/кг СВ). Каждый образец РЖ от 4 животных тестировали 4-кратно ($n = 16$). Образцы корма массой 500 мг раскладывали в полиамидные мешочки, которые затем помещались в инкубатор в смесь буферного раствора с рубцовой жидкостью на 48 ч при 39,5 °С. По окончании инкубации образцы промывали и высушивали при температуре 60 °С до постоянной массы. Вычисляли коэффициент переваримости сухого вещества *in vitro*. Проводили отбор проб воздуха отдельно из каждой емкости для определения содержания метана на приборе Кристаллюкс-2000М (ООО «НПФ «Метахром», Россия) методом газовой хроматографии. Количество летучих жирных кислот (ЛЖК) определяли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием на газовом хроматографе Кристаллюкс-4000М. Анализ содержания различных форм азота проводили на оборудовании фирмы «Millab» (Италия) методом Кьельдаля. Активность амилазы измеряли по Смитурою в модификации по Аносону для определения высокой активности фермента в панкреатическом соке. Активность протеолитических ферментов оценивали по количеству расщепленного казеина, очищенного по Гаммерстону, при колориметрическом контроле ($\lambda = 450$ нм). Сухое вещество биосубстратов определяли методом высушивания до постоянной массы при 60 °С. Установлено, что фитовещества *Salviae folia* и *Artemisiae absinthil herba* смещали ферментацию в сторону пропионата и бутирата. Присутствие *A. absinthil herba* усиливало интенсивность метаболизма азота в РЖ, при этом отмечали увеличение количества общего азота на 11,6 %, небелкового азота — на 144,3 %, аммиачного азота — на 71,4 %, мочевинового — на 31,7 % ($p \leq 0,05$). При добавлении фитовеществ значительно увеличивалась активность амилазы, протеаз, концентрация летучих жирных кислот, однако повышалось количество метана. Комбинации фитовеществ и хлорида кобальта оказывали положительное влияние на процессы ферментации *in vitro*. Максимальный эффект был выявлен при использовании *A. absinthil herba* и хлорида кобальта: зафиксировано повышение переваримости сухого вещества при снижении образования метана на 2,1 %, увеличении активности пищеварительных ферментов, а также концентрации летучих жирных кислот в РЖ.

Ключевые слова: *Artemisiae absinthil herba*, трава полыни, *Salviae folia*, листья шалфея, фитовещества, хлорид кобальта, азот, летучие жирные кислоты, метан, пищеварительные ферменты, “artificial rumen”, мясной скот.

* Исследование проводилось при финансовой поддержке гранта РНФ №21-76-10014.

Возникновение бактериальной резистентности и отказ от использования кормовых антибиотиков в качестве стимуляторов роста (1) привели к необходимости поиска их естественных и безопасных альтернатив, таких как пробиотики, пребиотики, минеральные компоненты или фитобиотики (2, 3).

В результате вторичного метаболизма растения производят разнообразные органические соединения, которые могут быть полезны для животных. Показано, что фитобиотики проявляют высокую биологическую активность. Они были исследованы в качестве модификаторов функций рубца у жвачных (4-6). Так, добавление смеси растительных экстрактов положительно влияло на ферментацию в рубце и показатели роста у быков, потреблявших большое количество кормовых концентратов (7). В другом исследовании (8) было выявлено позитивное влияние неомицина и листьев душицы на тяжесть течения заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также смертность новорожденных телят.

Установлено, что растения и содержащиеся в них биологически активные соединения с антимикробными свойствами способствуют улучшению использования корма и повышению продуктивности животных за счет изменения микробной ферментации в рубце (9). Однако в настоящее время растительные продукты используются в кормовой промышленности в основном в качестве добавок, ароматизаторов и веществ, возбуждающих аппетит (10). Несмотря на множество исследований, проведенных в основном *in vitro* и посвященных потенциальному применению фитобиотиков (6, 7), мало информации об их использовании в композиции с другими веществами с целью улучшения обменных процессов и стимуляции роста.

Ранее в экспериментах *in vitro* мы протестировали фитопрепараты *Salviae folia*, *Inulae rhizomata et radices*, *Artemisiae absinthil herba*, *Scutellaria baicalensis*, *Origanum vulgare* и отобрали образцы, показавшие наибольшую функциональную активность, — листья шалфея и траву полыни (11). Биологически активные вещества, входящие в состав растительных препаратов, такие как алкалоиды, флавоноиды, сапонины, дубильные вещества, фенольные соединения, терпеноиды и эфирные масла, оптимизируют белковый метаболизм, уменьшают выработку метана и снижают ацидоз, что в конечном итоге улучшает ферментацию в рубце (12). Для коррекции влияния растительных препаратов на метанообразование и ферментацию в рубце необходимо изучить эффективность использования их композиций с химическими элементами.

Кобальт рассматривается как перспективный химический элемент, поскольку он важен для микробной популяции в рубце жвачных, в частности для целлюлозолитических микроорганизмов. Кроме того, выработка жизненно важного для организма-хозяина и простейших витамина В₁₂ повышается с увеличением количества кобальта, доступного при бактериальном синтезе (13-15). Известно также, что смесь эфирных растительных ингредиентов и органического кобальта у мелких жвачных (16) способствовала снижению образования метана и аммиака в рубце и улучшению ферментации, а форма и количество кобальта оказывали токсическое действие на численность метаногенных бактерий (17).

В настоящей работе впервые описаны изменения метаболических параметров в рубцовой жидкости *in vitro* в условиях, когда к образцам рационов (биосубстратам) добавляли фитопрепараты и хлорид кобальта, определены наиболее эффективные сочетания и дозировки этих добавок. При использовании комплекса *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ) и CoCl₂ (1,5 мг/кг СВ) было установлено повышение переваримости сухого вещества, увеличение активности пищеварительных ферментов и содержания

метаболитов в рубцовой жидкости, а также снижение образования метана. Использование комплекса *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) и CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ) привело к максимальному снижению образования метана.

Цель работы — изучить влияние растительных препаратов и хлорида кобальта (отдельно и в сочетании друг с другом) на изменение метаболических параметров в рубцовой жидкости бычков методом *in vitro*.

Методика. Опыты проводили в 2021 году в ЦКП БСТ РАН (г. Оренбург). Материал для исследования получали от бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы ($N = 4$), средней массой 250-265 кг в возрасте 9-10 мес. Животных содержали индивидуально, на привязи, в типовых клетках, доступ к воде не ограничивали, кормление осуществляли 2 раза в сутки. Кормление подопытных животных было организовано с учетом рекомендаций А.П. Калашникова с соавт. (18).

Рубцовую жидкость (РЖ) отбирали спустя 12 ч после кормления, через хроническую фистулу рубца ($d = 80$ мм; «Ankom Technology Corp.», США) резиновым шлангом (наружный диаметр 40 мм) в термос объемом 3 л. Транспортировку осуществляли при 4-8 °С в течении 20-30 мин. РЖ, предварительно подогретую до 39 °С, использовали сразу по прибытии в лабораторию.

Исследования проводили *in vitro* с помощью инкубатора Ankom DaisyII («Ankom Technology Corp.», США) по специальной методике (19, 20). Перед использованием пробы РЖ фильтровали через 4 слоя марли и смешивали с буферным раствором в соотношении 1:4. Буферный раствор по химическому составу соответствовал слюне и поддерживал значение pH «искусственного рубца», близкое к физиологическому (pH 6,0-6,5). Перед смешиванием буферный раствор подогрели до 39 °С и насыщали CO_2 .

Для исследования были приготовлены I контрольный рацион, включавший 70 % грубых кормов (сено луговое разнотравное) и 30 % концентрированных кормов (ячмень дробленый), и пять опытных образцов, в состав которых входили дополнительные компоненты в виде фитовеществ и химических элементов: II — CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ; ООО «НПК «Асконт+», Россия), III — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ), IV — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ), V — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) + CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ), VI — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ) + CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ). Выбор дозировок растительных препаратов и хлорида хрома был основан на ранее проведенных исследованиях и рекомендациях (21, 22). Каждый образец РЖ от 4 животных тестировали 4-кратно ($n = 16$). *Salviae folia* (ЛСР-005376/07, АО «Красногорсклексредства», Россия) содержал 1,3-2,5 % эфирного масла, состоявшего из D- α -пинена, цинеола (около 15 %), α - и β -туйона, D-борнеола и D-камфоры. В листьях этого растения также обнаружены алкалоиды, флавоноиды, дубильные вещества, олеаноловая и урсоловая кислоты (21). *Artemisiae absinthil herba* (ЛСР-000171/08, ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Россия) содержал сесквитерпеновые лактоны, горькие гликозиды (абсинтин, анабсинтин, артабсин и др.), придающие растению своеобразный горький вкус, сапонины, флавоноиды, фитонциды, аскорбиновую кислоту, смолистые и дубильные вещества, калийные соли, артемизетин, эфирное масло (0,2-0,5 %), каротин, органические кислоты (яблочную, янтарную) (21).

Образцы корма массой 500 мг раскладывали в полиамидные мешочки, которые затем помещали в инкубатор в смесь буферного раствора с рубцовой жидкостью и инкубировали 48 ч при температуре 39,5 °С. По окончании инкубации образцы промывали и высушивали при температуре 60 °С до постоянной массы.

Коэффициент переваримости сухого вещества *in vitro* вычисляли как разницу массы образца корма с мешочком до и после инкубации по формуле $K = (A - B)/C \times 100 \%$, где K — коэффициент переваримости сухого вещества корма, %, A — масса образца корма с мешочком до инкубации, мг, B — масса образца корма с мешочком после инкубации, мг, C — исходная масса образца корма без массы мешочка до инкубации, мг.

После инкубации проводили отбор проб воздуха отдельно из каждой емкости инкубатора в специальные стеклянные шприцы объемом 200 мл³ с резиновыми пробками для определения содержания метана на приборе Кристаллюкс-2000М (ООО «НПФ «Мета-хром», Россия) методом газовой хроматографии. Количество летучих жирных кислот (ЛЖК) в РЖ определяли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием на газовом хроматографе Кристаллюкс-4000М. Содержание различных форм азота оценивали на оборудовании фирмы «Millab» (Италия) по Кьельдалю.

Активность амилазы измеряли по Смиуту-Рою в модификации по Аносону для определения высокой активности фермента в панкреатическом соке (23) и выражали в мг расщепленного крахмала \cdot мл⁻¹ \cdot мин⁻¹. Методика определения активности амилазы основана на гидролизе крахмального клейстера. Измеряя интенсивность окрашивания раствора крахмала с йодным реактивом на КФК-3-01 (ОАО «ЗОМЗ», Россия), устанавливали скорость гидролиза клейстера (субстрат амилазы). Активность протеолитических ферментов оценивали по количеству расщепленного казеина, очищенного по Гаммерстену, при колориметрическом контроле ($\lambda = 450$ нм) (24). Методика основывалась на колориметрическом определении концентрации казеина на КФК-3-01. Сухое вещество биосубстратов (СВ) определяли методом высушивания до постоянной массы при 60 °С.

Обслуживание животных и экспериментальные исследования выполняли в соответствии с инструкциями и рекомендациями нормативных актов: 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 экспериментов были предприняты меры, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшить число опытных образцов.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы SPSS Statistics 20 («IBM», США). Рассчитывали средние значения (M), стандартные ошибки средних (\pm SEM). Статистическую значимость различий между опытными и контрольной группами определяли с использованием t -критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$.

Результаты. Структура и питательность рациона животных, от которых получали пробы рубцовой жидкости, представлены в таблице 1.

Переваримость СВ рациона при включении фитовеществ увеличилась в третьем образце на 1,3 % ($p \leq 0,05$), а в четвертом уменьшалась на 2,9 % относительно контроля (рис. 1). Введение хлорида кобальта повышало переваримость СВ на 1,5 %. Наилучшая переваримость была отмечена при использовании композиции *Artemisiae absinthil herba* + CoCl₂ — на 2,1 % выше, чем в контроле ($p \leq 0,05$). В присутствии *Salviae folia* + CoCl₂ показатель был выше контроля на 1,3 %. Полученные результаты косвенно подтверждаются ранее проведенными исследованиями, где было установлено, что эфирное масло некоторых видов *Artemisiae* улучшало ферментацию в рубце *in vitro* и усвояемость сухого вещества (25). Этот факт объясняется вероятным повышением содержания терпенов, в значительном количестве

присутствующих в экстракте полыни. Известно, что потребление корма обратно пропорционально концентрации терпенов в рационе, и жвачные не могут потреблять терпены выше порогового значения (26). Терпеноидные экстракты полыни подавляют микрофлору рубца и снижают скорость переваривания целлюлозы (27). Кроме того, J.P. Wu с соавт. (28) отмечали изменение ферментации в рубце и лучшее усвоение веществ при добавлении смеси эфирных масел орегано (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*) и лактата кобальта. Аналогичный эффект наблюдался в нашем эксперименте в вариантах с *S. folia* (*Lamiaceae*) и *A. absinthil herba*.

1. Состав и питательность суточного рациона (расчет на 1 гол.) бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы, от которых получали рубцовую жидкость (ЦКП БСТ РАН, 2021 год)

Показатель	Количество
Сено разнотравное, кг	4,5
Сено бобовое, кг	3,2
Концентраты, кг	1,8
Соль поваренная, кг	0,035
Витамин А, тыс. МЕ	30,0
Витамин D, тыс. МЕ	2,7
В рационе содержалось:	
сухое вещество, кг	8,78
обменная энергия, МДж	70,0
сырой протеин, кг	0,52
сырая клетчатка, кг	2,46
нейтрально-детергентная клетчатка, кг	0,55
кислотно-детергентная клетчатка, кг	0,41
гемицеллюлоза, кг	0,15
сырой жир, кг	0,24
органическое вещество, кг	8,20
кальций, г	45,0
фосфор, г	33,0

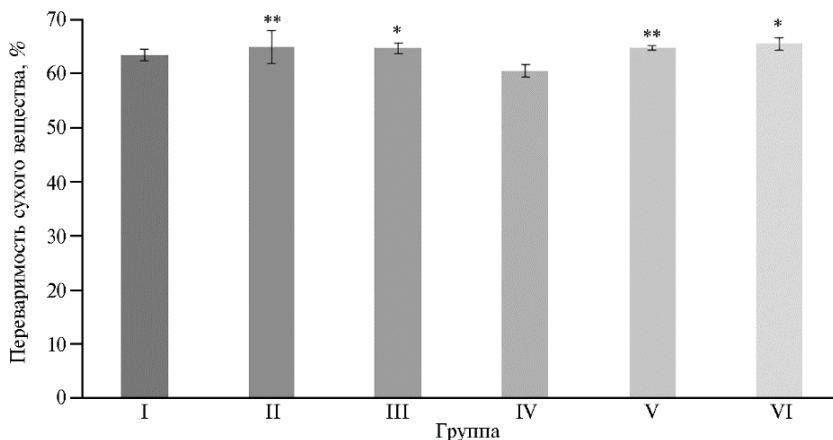


Рис. 1. Переваримость *in vitro* сухого вещества рационов с добавками фитопрепаратов и CoCl_2 после нахождения в течение 48 ч в рубцовой жидкости бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы: I — контрольный рацион, II — CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ), III — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ), IV — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ), V — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) + CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ), VI — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ) + CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ) ($n = 16$, $M \pm \text{SEM}$, ЦКП БСТ РАН, 2021 год).

* и ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

Использование *Artemisiae absinthil herba* повышало содержание общего азота на 11,6 % ($p \leq 0,05$) относительно контроля. Во II образце количество общего азота снижалось на 10,6 %, в III — на 22 %, в V — на 19,7 %, в VI — на 14,4 % ($p \leq 0,05$). В отношении белкового азота была обнаружена прямая взаимосвязь с обменом общего азота (табл. 2). Содержание небелкового азота в опытных вариантах, напротив, было выше, чем в контрольном:

в III — на 76,7 % ($p \leq 0,05$), в IV — на 144,3 % ($p \leq 0,05$), в V — на 28,3 %, в VI — на 16,7 %.

2. Содержание азота после инкубации *in vitro* образцов рационов с добавками фитопрепаратов и CoCl_2 в рубцовой жидкости бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы ($n = 16$, $M \pm \text{SEM}$, ЦКП ФНЦ БСТ РАН, 2021 год)

Вариант	Форма азота, мг%				
	общий	небелковый	аммиачный	мочевинный	белковый
I (контроль)	92,4±1,71	21,0±1,13	4,2±0,90	4,1±1,51	71,4±2,02
II (CoCl_2 , 1,5 мг/кг СВ)	82,6±1,12	19,6±1,42	3,5±0,91	6,4±1,20*	63,0±1,33
III (<i>Salviae folia</i> , 1,6 г/кг СВ)	72,1±1,83*	37,1±1,31*	5,9±0,51*	6,0±0,81	35,0±1,21*
IV (<i>Artemisiae absinthil herba</i> , 2,0 г/кг СВ)	103,1±1,61*	51,3±1,71*	7,2±1,81	5,4±1,92	51,8±1,43
V (<i>Salviae folia</i> , 1,6 г/кг СВ + CoCl_2 , 1,5 мг/кг СВ)	74,2±1,41*	26,9±1,32	3,9±0,73	4,5±1,13	47,3±1,71*
VI (<i>Artemisiae absinthil herba</i> , 2,0 г/кг СВ + CoCl_2 , 1,5 мг/кг СВ)	79,1±1,22*	24,5±1,53	6,7±0,82*	4,5±1,31	54,6±1,51*

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Содержание различных биологически активных веществ в растениях (29, 30), которые поедают животные, способствует изменению ферментативных процессов рубца. Возможна зависимость и от дозировки вводимых компонентов. Так, высокое содержание полыни в рационе овец приводило к увеличению количества аммиака и азота в рубце (31). Кобальт необходим ферментативным системам микроорганизмов рубца, участвующих в метаболизме питательных веществ (32, 33).

Вероятный механизм действия фитовеществ заключается в их способности ингибировать активность бактерий, продуцирующих аммиак в рубце, с соответствующим изменением содержания азота в рубцовой жидкости (34). Кроме того, снижение концентрации азотистых веществ может быть связано с увеличением протеолитической активности микроорганизмов, что мы обсудим ниже.

Содержание аммиачного азота оказалось максимальным при использовании *Artemisiae absinthil herba* как отдельно, так и в сочетании с CoCl_2 — соответственно 7,2±1,81 и 6,7±0,82 мг% (см. табл. 2).

Введение в микрорацион фитовеществ привело к повышению активности пищеварительных ферментов, амилазы и протеаз в РЖ *in vitro* (рис. 2, 3). Так, активность амилазы была выше относительно контроля во II образце на 64,5 % ($p \leq 0,05$), в III — на 303,7 % ($p \leq 0,05$), в IV — на 164,6 % ($p \leq 0,05$), в V — на 130,7 % ($p \leq 0,05$), в VI — на 11,9 %. Максимальная амилолитическая активность зафиксирована при использовании *S. folia*. Наши результаты подтверждают ранее полученные данные, согласно которым отвары надземной части *Salvia aegyptiaca* и *Salvia verbenaca* проявляли более низкую активность в отношении фермента α -амилазы (35). Имеется и противоположное мнение (36) о том, что водный раствор *Salvia eriophora* ингибировал фермент α -амилазу на фоне присутствия фенольных веществ (фумаровая и кофейная кислота, эпикатехин) в составе экстракта.

В контроле активность протеаз составила 32,7±0,12 мг · мл⁻¹ · мин⁻¹, наиболее высоким показателем был при совместном использовании *S. folia* и CoCl_2 — в 12,4 раза выше контроля ($p \leq 0,05$). В VI образце протеолитическая активность оказалась выше в 7,3 раза, чем в контроле ($p \leq 0,05$). Использование хлорида кобальта усиливало активность в 3,2 раза ($p \leq 0,05$), а фитовеществ *S. folia* и *A. absinthil herba* — в 3,4 раза ($p \leq 0,05$).

В доступной литературе данные по этому вопросу противоречивы. Так, сальвианоловая кислота, наиболее распространенный биологически

активный компонент *Salvia miltiorrhiza*, способна ингибировать действие металлопротеиназы (37). В то же время высокая протеолитическая активность могла быть связана с доминирующим действием кобальта. Известно, что водные металлокомплексы с кобальтом усиливают протеолитическую активность (38). Что касается *Artemisiae*, то эти виды трав содержат в своем составе азотистые метаболиты (39), вероятно, способствующие активации протеаз микроорганизмов рубца.

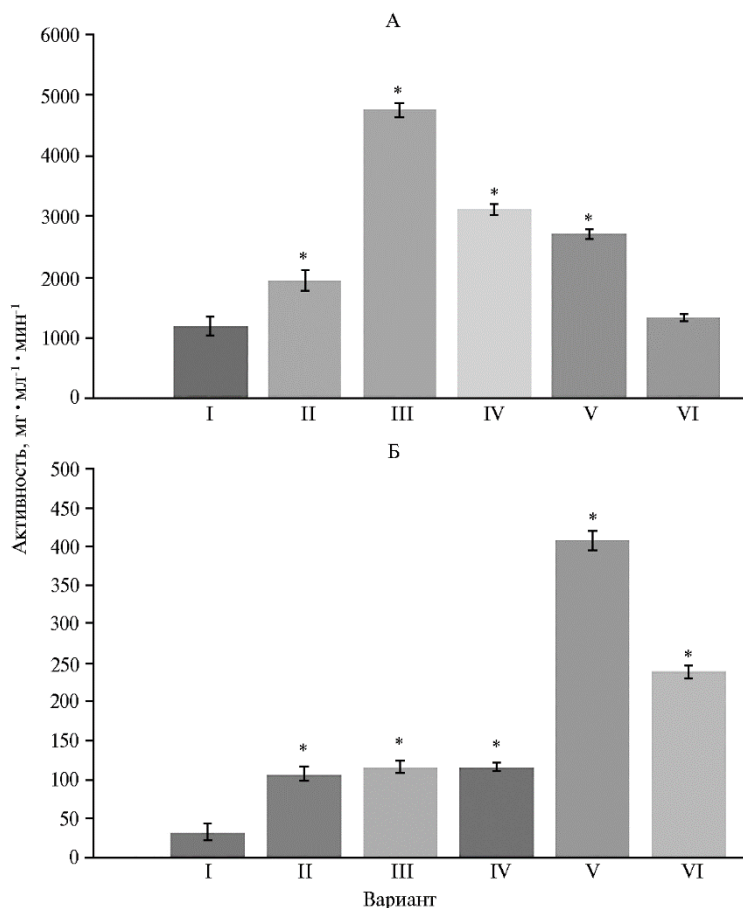


Рис. 2. Активность амилазы (А) и протеолитических ферментов (Б) после инкубации *in vitro* образцов рационов с добавками фитопрепаратов и CoCl_2 в рубцовой жидкости бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы: I — контрольный рацион, II — CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ), III — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ), IV — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ), V — *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) + CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ), VI — *Artemisiae absinthil herba* (2,0 г/кг СВ) + CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ) ($n = 16$, $M \pm \text{SEM}$, ЦКП БСТ РАН, 2021 год).

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Наши исследования показали, что фитовещества *S. folia* и *A. absinthil herba* могут смещать ферментацию в рубце в сторону пропионата и бутирата. При использовании *A. absinthil herba* мы отмечали усиление метаболизма азота в РЖ, при этом наблюдалось увеличение количества общего азота на 11,6 %, небелкового азота — на 144,3 %, аммиачного азота — на 71,4 %, мочевинового — на 31,7 % ($p \leq 0,05$). Ранее было установлено, что использование фитовеществ сдвигает ферментацию в рубце в сторону пропионата и снижает концентрацию аммиака и выработку метана за счет воздействия биологически активных веществ, таких как терпеноиды (40, 41) и эфирные масла (42, 43) и танины (44), на микроорганизмы рубца. Увеличение количества

азотистых веществ может быть связано также с наличием аналогичных метаболитов в *Artemisiae* (39).

Содержание ЛЖК в контрольном и опытных вариантах с добавлением фитовеществ оказалось достаточно низким (табл. 3). Включение в микрорации хлорида кобальта увеличивало концентрацию уксусной кислоты при тестировании II и V образцов в 3,6 раза ($p \leq 0,01$), VI — в 6,6 раза ($p \leq 0,01$) относительно контрольных значений. Концентрация пропионовой кислоты также увеличивалась во всех опытных вариантах с CoCl_2 : в присутствии *S. folia* в 26 раз ($p \leq 0,01$), *A. absinthil herba* — в 36 раз ($p \leq 0,05$). Результаты свидетельствуют о том, что дополнительное включение хлорида кобальта может повышать активность микробной метилмалонил-КоА-мутазы, что способствует увеличению количества пропионовой кислоты в рубцовом содержимом (45).

3. Концентрация летучих жирных кислот после инкубации *in vitro* образцов рационов с добавками фитопрепаратов и CoCl_2 в рубцовой жидкости бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы ($n = 16$, $M \pm \text{SEM}$, ЦКП БСТ РАН, 2021 год)

Вариант	Летучие жирные кислоты, ммоль/л				
	уксусная	пропионовая	масляная	валерьяновая	капроновая
I (контроль)	0,070±0,0002	0,010±0,0001	0,020±0,0001	0,030±0,0004	0,008±0,0006
II (CoCl_2 , 1,5 мг/кг)	0,250±0,0050**	0,014±0,0003	0,008±0,0020	0,020±0,0011	0,006±0,0010
III (<i>Salviae folia</i> , 1,6 г/кг)	0,070±0,0020	0,050±0,0040*	0,060±0,0030*	0,041±0,0050	0,014±0,0003
IV (<i>Artemisiae absinthil herba</i> , 2,0 г/кг)	0,080±0,0010	0,020±0,0010	0,170±0,0020*	0,063±0,0040	0,030±0,0010
V (<i>Salviae folia</i> , 1,6 г/кг + CoCl_2 , 1,5 мг/кг)	0,250±0,0030	0,260±0,0020**	0,160±0,0030*	0,190±0,0020**	0,140±0,0020**
VI (<i>Artemisiae absinthil herba</i> , 2,0 г/кг + CoCl_2 , 1,5 мг/кг)	0,460±0,0060**	0,36±0,00400*	0,180±0,0050*	0,030±0,0001	0,050±0,0002**

* и ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$.

Количество масляной кислоты было выше контроля во всех вариантах с фитовеществами: в III — в 3,0 раза, в IV — в 8,5 раза, в V — в 8,0 раза, в VI — в 9,0 раза ($p \leq 0,05$). Пропионовая кислота — единственная глюко-неогенная ЛЖК, образующаяся в рубце, которая всасывается и метаболизируется в сукцинат в результате ряда реакций (46, 47). Однако хлорид кобальта в дозировке 1,5 мг/кг СВ не оказал влияния на производство пропионата, способствовал снижению количества бутирата и повышению метанообразования на 51,2 % ($p \leq 0,05$). Витамин В₁₂ служит фактором роста для руминальных бактерий, таких как *Prevotella ruminicola* и *Methanomicrobium mobile*. *Prevotella ruminicola*, деятельность которых повышает содержание пропионовой кислоты в рубцовом содержимом, что способствует увеличению концентрации метана.

Комбинации фитовеществ и хлорида кобальта положительно влияли на процессы ферментации *in vitro* в РЖ. Наилучший эффект был выявлен при использовании *A. absinthil herba* и хлорида кобальта: зафиксировано повышение переваримости СВ, при этом выработка метана снизилась на 33,9 %, увеличилось количество пищеварительных ферментов, а также концентрация ЛЖК в рубцовой жидкости (см. табл. 3, 4).

При промышленном производстве говядины крайне важен контроль за выбросом парниковых газов. Так, полифенолы, содержащиеся в фитобиотиках, могут существенно влиять на микробиом пищеварительной системы жвачных животных, включая сокращение обилия метаногенных архей (48). Эфирные масла благодаря их естественному происхождению и безопасности все чаще используются для модификации микробиома, особенно с целью снижения выработки метана у жвачных животных (34).

Концентрация метана в наших опытах при использовании хлорида кобальта повышалась относительно контрольных значений на 51,2 %, при введении *Salviae folia* — на 16,5 % ($p \leq 0,05$). Композиции фитовеществ и хлорида кобальта способствовали снижению образования метана в рубце жвачных на 46,3 и 33,9 % соответственно в V и в VI образцах ($p \leq 0,05$) (см. табл. 4).

4. Выделение метана после инкубации *in vitro* образцов рационов с добавками фитопрепаратов и CoCl_2 в рубцовой жидкости бычков (*Bos taurus taurus*) казахской белоголовой породы ($n = 16$, $M \pm \text{SEM}$, ЦКП БСТ РАН, 2021 год)

Вариант	Концентрация метана	
	CH_4 , г/м ³	эквивалент CO_2 с/г
I (контроль)	12,1±2,2	302,5±1,1
II (CoCl_2 , 1,5 мг/кг)	18,3±2,3*	457,5±3,1*
III (<i>Salviae folia</i> , 1,6 г/кг)	14,1±1,9*	352,5±2,4
IV (<i>Artemisiae absinthil herba</i> , 2,0 г/кг)	9,4±2,4	235,0±1,9*
V (<i>Salviae folia</i> , 1,6 г/кг + CoCl_2 , 1,5 мг/кг)	6,5±1,2*	162,5±2,3
VI (<i>Artemisiae absinthil herba</i> , 2,0 г/кг + CoCl_2 , 1,5 мг/кг)	8,0±1,4*	200,0±2,5

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

В некоторых работах сообщалось, что фитовещества эффективно снижают концентрацию ацетата и аммиака в рубце и выработку метана у мелких жвачных и мясного скота (49-51). В наших опытах количество метана снижалось только в варианте с *A. absinthil herba* на 22,3 %, а в варианте с *S. folia*, напротив, повышалось на 16,5 % ($p \leq 0,05$).

Вероятным механизмом снижения метаногенеза может быть ингибирование ферментов, ответственных за этот процесс. Известно, что метил-КоМ-редуктаза играет значительную роль в метаногенезе (51). Поиск молекул-мишеней для ингибирования этого фермента у жвачных животных — важная задача. Получены данные, что фитохимические вещества имеют лучшую аффинность к водородной связи и могут использоваться для снижения метаногенеза (52).

Возможно, снижение метаногенеза происходит и в результате изменения в популяциях метаногенных бактерий в рубцовой жидкости. Ранее обнаружено, что экстракт *A. capillaris* уменьшал выделение метана на 14 % ($p < 0,05$) после 48 ч инкубации при снижении численности сообществ метаногенов (инфузории и популяции метанобактерий) (53). Аналогичный эффект наблюдался под влиянием смеси эфирных масел и карбоната кобальта (16). Кроме того, некоторые источники и дозировки кобальта оказывали токсическое воздействие на численность метаногенных бактерий (17).

Количество CH_4 и эквивалент CO_2 были максимально снижены при использовании композиции *Salviae folia* и CoCl_2 ($p \leq 0,05$). Молярные доли ацетата, пропионата и бутирата в этом варианте значительно повышались относительно контроля, при этом интенсивность обмена азота в РЖ была высокой. Установлено что введение кобальта в микрорацион без фитовеществ не снижало метанообразования и ухудшало переваримость СВ рациона. Ранее уже отмечалось, что суммарное содержание и количество некоторых короткоцепочечных жирных кислот в отдельности, соотношение ацетат:пропионат, рН и общее газообразование в рубце жвачных значительно зависят от определенных растительных субстратов (полынь, ромашка, фураж и мальва) (54), что наблюдалось и в наших экспериментах.

Таким образом, изменения метаболических параметров в рубцовой жидкости бычков *in vitro* при использовании растительных препаратов и хлорида кобальта (по отдельности и в сочетании) в составе биосубстратов не были единообразными. Фитовещества значительно повышали в рубцовой жидкости активность амилазы, протеаз, концентрацию летучих жирных

кислот и активировали обмен азота, но также увеличивали количество выделяемого метана. Сочетание *Artemisiae absinthil herba* и *Salviae folia* с CoCl_2 снижало метанообразование и усиливало процессы метаболизации. При использовании комплекса *Artemisiae absinthil herba* в дозировке 2,0 г/кг СВ и CoCl_2 в дозе 1,5 мг/кг СВ отмечено увеличение активности пищеварительных ферментов и содержания метаболитов в рубцовой жидкости *in vitro*, снижение образования метана на 33,9 %, при этом переваримость СВ повышалась на 2,1 % по сравнению с контролем. Комплекс *Salviae folia* (1,6 г/кг СВ) и CoCl_2 (1,5 мг/кг СВ) максимально снижал образование метана (на 46,3 %). Растительные препараты способствовали увеличению в рубцовой жидкости активности амилазы в 2,6-4,0 раза и протеазы в 3,6 раза при сравнении с контрольным вариантом. Однако мы не выявили закономерностей в изменении метаболических параметров в рубцовой жидкости в зависимости от доз при сочетании растительных препаратов и хлорида кобальта, поэтому мы планируем продолжить изучение влияния фитовеществ (по отдельности или в сочетании с другими веществами) на микробиом рубца жвачных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chattopadhyay M.K. Use of antibiotics as feed additives: a provocative question. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 1-3 (doi: 10.3389/fmicb.2014.00334).
2. Khiaosa-ard R., Zebeli Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(4): 1819-1830 (doi: 10.2527/jas.2012-5691).
3. National Research Council. *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. National Academies Press, Washington, DC, 2007.
4. Oh J., Hristov A.N. Effects of plant-derived bioactive compounds on rumen fermentation, nutrient utilization, immune response, and productivity of ruminant animals. In: *Medicinal and aromatic crops: production, phytochemistry, and utilization* /V.D. Jeliakov (Zheljazkov), C.L. Cantrel (eds.). American Chemical Society Publications, 2016, Washington, DC: 167-186 (doi: 10.1021/bk-2016-1218.ch011).
5. Oh J., Wall E.H., Bravo D.M., Hristov A.N. Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: a review. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(7): 5983-5983 (doi: 10.3168/jds.2016-12341).
6. Kuralkar P., Kuralkar S.V. Role of herbal products in animal production — an updated review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 278: 114246 (doi: 10.1016/j.jep.2021.114246).
7. Devant M., Anglada A., Bach A. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 137(1-2): 46-57 (doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2006.10.003).
8. Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E. Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. *Journal of Veterinary Medicine Series*, 2006, 53(3): 154-156 (doi: 10.1111/J.1439-0442.2006.00806.X).
9. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castellanos L., Ferret A. Invited review Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(6): 2580-2595 (doi: 10.3168/JDS.2006-644).
10. Franz C.K., Baser H.C., Windisch W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, 25(5): 327-340 (doi: 10.1002/FFJ.1967).
11. Sheida E.V., Ryazanov V.A., Denisenko K.S., Shoshina O.V. Changes in the concentration of methane in the ecosystem *in vitro* against the background of *Asteraceae* family plants biomass. *BIO Web of Conferences*, 2022, 42: 01015 (doi: 10.1051/bioconf/20224201015).
12. Kumar M., Kumar V., Roy D., Kushwaha R., Vaswani S. Application of herbal feed additives in animal nutrition — a review. *International Journal of Livestock Research*, 2014, 4(9): 1-8 (doi: 10.5455/ijlr.20141205105218).
13. Stangl G., Schwarz F., Müller H., Kirchgessner M. Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B₁₂, folate, homocysteine and methylmalonic acid. *British Journal of Nutrition*, 2000, 84(5): 645-653 (doi: 10.1017/S0007114500001987).
14. González-Montaña J.R., Escalera-Valente F., Alonso A.J., Lomillos J.M., Robles R., Alonso M.E. Relationship between vitamin B₁₂ and cobalt metabolism in domestic ruminant: an update. *Animals*, 2020, 10(10): 1855 (doi: 10.3390/ani10101855).
15. Dezfoulian A.H., Aliarabi H. A comparison between different concentrations and sources of cobalt in goat kid nutrition. *Animal*, 2017, 11(4): 600-607 (doi: 10.1017/S175173111600197X).
16. Lei Z., Zhang K., Li C., Jiao T., Wu J., Wei Y., Tian K., Li C., Tang D., Davis D.I., Casper D.P.,

- Jiang H., Wang X., Wang J. Ruminant metagenomic analyses of goat data reveals potential functional microbiota by supplementation with essential oil-cobalt complexes. *BMC Microbiol.*, 2019, 19(1): 30 (doi: 10.1186/s12866-019-1400-3).
17. Abdelsalam E., Samer M., Attia Y.A., Abdel-Hadi M.A., Hassan H.E., Badr Y. Effects of Co and Ni nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of slurry. *Energy Conversion and Management*, 2017, 141: 108-119 (doi: 10.1016/j.enconman.2016.05.051).
 18. Калашников А.П., Фисинин В.И., Щеглов В.В., Клейменов Н.И. *Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие, 3-е изд. переработанное и дополненное.* М., 2003.
 19. Tassone S., Fortina R., Peiretti P.G. In vitro techniques using the DaisyII incubator for the assessment of digestibility: a review. *Animals*, 2020, 10(5): 775 (doi: 10.3390/ani10050775).
 20. Amin N., Tagliapietra F., Arango S., Guzzo N., Bailoni L. Free and Microencapsulated essential oils incubated in vitro: ruminal stability and fermentation parameters. *Animals*, 2021, 11(1): 180 (doi: 10.3390/ani11010180).
 21. Pashtetsky V., Ostapchuk P., Kuevda T., Zubochenko D., Yemelianov S., Uppe V. Use of phytochemicals in animal husbandry and poultry. *E3S Web of Conferences*, 2020: 02002 (doi: 10.1051/e3sconf/202021502002).
 22. Gartner R., Young J., Pepper P.M. Hepatic copper concentration of steers grazing pastures on developed wet heath land in southeastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 1968, 8(35) 679-682.
 23. Батоев Ц.Ж. Динамика сокоотделения и выделение ферментов поджелудочной железы у птиц. *Физиологический журнал СССР имени И.М. Сеченова*, 1972, 58(11): 1771-1773.
 24. Батоев Ц.Ж. Фотометрическое определение активности протеолитических ферментов поджелудочного сока по уменьшению концентрации казеина. *Вопросы физиологии и патологии животных: Сборник трудов Бурятского государственного сельскохозяйственного института*, 1971, 25: 22-26.
 25. Lee S.S., Kim D.H., Paradhita D.H.V., Lee H.J., Yoon H., Joo Y.H., Adesogan A.T., Kim S.C. Effects of wormwood (*Artemisia montana*) essential oils on digestibility, fermentation indices, and microbial diversity in the rumen. *Microorganisms*, 2020, 8(10): 1605 (doi: 10.3390/microorganisms8101605).
 26. Villalba J.J., Provenza F.D., Olson K.C. Terpenes and carbohydrate source influence rumen fermentation, digestibility, intake, and preference in sheep. *J. Anim. Sci.*, 2006, 84(9): 2463-2473 (doi: 10.2527/jas.2005-716).
 27. Nagy J.G., Tengerdy R.P. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* (big sagebrush) on bacteria from, 1968, 16(3): 441-444 (doi: 10.1128/am.16.3.441-444.1968).
 28. Wu J.P., Zhou R., Liu L.S., Casper D.P., Lang X., Wang C.L., Zhang L.P., Wei S., Liu H.B. Growth performance, nutrient digestibility, blood parameters, and carcass characteristics by lambs fed an oregano and cobalt blend. *Animal*, 2021, 15(10): 100365 (doi: 10.1016/j.animal.2021.100365).
 29. Batiha G.E.-S., Olatunde A., El-Mleeh A., Hetta H.F., Al-Rejaie S., Alghamdi S., Zahoor M., Magdy Beshbishy A., Murata T., Zaragoza-Bastida A., Rivero-Perez N. Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of wormwood (*Artemisia absinthium*). *Antibiotics*, 2020, 9(6): 353 (doi: 10.3390/antibiotics9060353).
 30. Ayrle H., Mevissen M., Kaske M., Nathues H., Gruetzner N., Melzig M., Walkenhorst M. Medicinal plants — prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. *BMC Vet. Res.*, 2016, 6(12): 89 (doi: 10.1186/s12917-016-0714-8).
 31. Kim S.C., Adesogan A.T., Kim J.H., Ko Y.D. Influence of replacing rice straw with wormwood (*Artemisia montana*) silage on feed intake, digestibility and ruminal fermentation characteristics of sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 128(1-2): 1-13 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.09.011).
 32. Bishehsari S., Tabatabaei M.M., Aliarabi H., Alipour D., Zamani P., Ahmadi A. Effect of dietary cobalt supplementation on plasma and rumen metabolites in Mehraban lambs. *Small Ruminant Research*, 2010, 90(1-3): 170-173 (doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2010.02.010).
 33. Kadim I.T., Johnson E.H., Mahgoub O., Srikandakumar A., Al-Ajmi D., Ritchie A., Annamalai K., Al-Halhal A.S. Effect of low levels of dietary cobalt on apparent nutrient digestibility in Omani goats. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, 109(1-4): 209-216 (doi: 10.1016/S0377-8401(03)00174-3).
 34. Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R., Newbold C.J. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 2008, 147(1-3): 8-35 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007).
 35. Mamache W., Amira S., Ben Souici C., Laouer H., Benchikh F. In vitro antioxidant, anticholinesterases, anti- α -amylase, and anti- α -glucosidase effects of Algerian *Salvia aegyptiaca* and *Salvia verbenaca*. *J. Food. Biochem.*, 2020, 44(11): e13472 (doi: 10.1111/jfbc.13472).
 36. Bursal E., Aras A., Kılıç Ö., Taslimi P., Gören A.C., Gülçin İ. Phytochemical content, antioxidant activity, and enzyme inhibition effect of *Salvia eriophora* Boiss. & Kotschy against acetylcholinesterase, α -amylase, butyrylcholinesterase, and α -glucosidase enzymes. *J. Food. Biochem.*, 2019,

- 43(3): 12776 (doi: 10.1111/jfbc.12776).
37. Liang Y.H., Li P., Huang Q.F., Zhao J.X., Liu X., Dai M.K. Salvianolic acid B in vitro inhibited matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 activities. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2009, 7(2): 145-150 (doi: 10.3736/jcim20090210).
 38. Kim H.M., Jang B., Cheon Y.E., Suh M.P., Suh J. Proteolytic activity of Co(III) complex of 1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane: a new catalytic center for peptide-cleavage agents. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, 14(1): 151-157 (doi: 10.1007/s00775-008-0434-z).
 39. Ur Rashid M., Alamzeb M., Ali S., Ullah Z., Shah Z.A., Naz I., Khan M.R. The chemistry and pharmacology of alkaloids and allied nitrogen compounds from *Artemisia* species: a review. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(10): 2661-2684 (doi: 10.1002/ptr.6466).
 40. Klevenhusen F., Muro-Reyes A., Khiaosa-ard R., Metzler-Zebeli B.U., Zebeli Q. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 176(1-4): 61-69 (doi: 10.1016/j.anifeeds.2012.07.008).
 41. Kholif A.E., Matloup O.H., Morsy T.A., Abdo M.M., Abu Elella A.A., Anela U.Y., Swanson K.C. Rosemary and lemongrass herbs as phyto-genic feed additives to improve efficient feed utilization, manipulate rumen fermentation and elevate milk production of Damascus goats. *Journal of Livestock Science*, 2017, 204: 39-46 (doi: 10.1016/j.livsci.2017.08.001).
 42. Kholif A.E., Olafadehan O.A. Essential oils and phyto-genic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Pharmacological Reviews*, 2021, 20: 1087-1108 (doi: 10.1007/S11101-021-09739-3).
 43. Patra A.K. *Dietary phytochemicals and microbes*. Springer, New York, 2012 (doi: 10.1007/978-94-007-3926-0).
 44. Patra A.K., Saxena J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(1): 24-37 (doi: 10.1002/jsfa.4152).
 45. Tiffany M.E., Fellner V., Spears J.W. Influence of cobalt concentration on vitamin B12 production and fermentation of mixed ruminal microorganisms grown in continuous culture flow-through fermenters. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(3): 635-640 (doi: 10.2527/2006.843635x).
 46. Kennedy D.G., Blanchflower W.J., Scott J.M., Weir D.G., Molloy A.M., Kennedy S., Young P.B. Cobalt-vitamin B12 deficiency decreases methionine synthase activity and phospholipids methylation in sheep. *The Journal of Nutrition*, 1992, 122(7): 1384-1392 (doi: 10.1093/JN/122.7.1384).
 47. Kennedy D.G., Young P.B., McCaughey W.J., Kennedy S., Blanchflower W.J. Rumen succinate production may ameliorate the effects of cobalt-vitamin B-12 deficiency on methylmalonyl CoA mutase in sheep. *The Journal of Nutrition*, 1991, 121(8): 1236-1242 (doi: 10.1093/JN/121.8.1236).
 48. Jouany J.-P., Morgavi D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animals*, 2007, 1(10): 1443-1466 (doi: 10.1017/S1751731107000742).
 49. Hashemzadeh-Cigari F., Ghorbani G.R., Khorvash M., Riasi A., Taghizadeh A., Zebeli Q. Supplementation of herbal plants differently modulated metabolic profile, insulin sensitivity, and oxidative stress in transition dairy cows fed various extruded oil seeds. *Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 118(1): 45-55 (doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.10.013).
 50. Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash M., Ghorbani G.R., Kadivar M., Riasi A., Zebeli Q. Effects of supplementation with a phyto-biotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(12): 7487-7497 (doi: 10.3168/jds.2014-7989).
 51. Patra A., Park T., Kim M., Yu Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8: 13.
 52. Dinakarkumar Y., Rajabathar J.R., Arokiyaraj S., Jeyaraj I., Anjaneyulu S.R., Sandeep S., Karthik C.S., Appaturi J.N., Wilson L.D. Anti-methanogenic effect of phytochemicals on methyl-coenzyme-M-reductase-Potential: in silico and molecular docking studies for environmental protection. *Micromachines*, 2021, 12(11): 1425 (doi: 10.3390/mi12111425).
 53. Kim E.T., Moon Y.H., Min K.-S., Kim C.-H., Kim S.C., Ahn S.K., Lee S.S. Changes in microbial diversity, methanogenesis and fermentation characteristics in the rumen in response to medicinal plant extracts. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2013, 26(9): 1289-1294 (doi: 10.5713/ajas.2013.13072).
 54. Petrič D., Mravčáková D., Kucková K., Čobanová K., Kišidayová S., Cieslak A., Ślusarczyk S., Váradyová Z. Effect of dry medicinal plants (wormwood, chamomile, fumitory and mallow) on in vitro ruminal antioxidant capacity and fermentation patterns of sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104(5): 1219-1232 (doi: 10.1111/jpn.13349).

*1*ФГБНУ Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН,

60000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,
e-mail: elena-shejda@mail.ru ✉, vita7456@yandex.ru, gduskaev@mail.ru;

*2*ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет,
460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13

Поступила в редакцию
11 июля 2022 года

METABOLIC PARAMETERS AND METHANOGENESIS IN THE RUMEN LIQUID IN *in vitro* TESTING EXPERIMENTAL DIETS SUPPLEMENTED WITH PHYTOBIOTICS AND CoCl₂

E.V. Sheida¹, ²✉, V.A. Ryazanov¹, G.K. Duskaev¹

¹Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, 29, ul. 9 Yanvaryaya, Orenburg, 460000 Russia, e-mail elena-shejida@mail.ru (✉ corresponding author), vita7456@yandex.ru, gduskaev@mail.ru;

²Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia

ORCID:

Sheida E.V. orcid.org/0000-0002-2586-613X

Duskaev G.K. orcid.org/0000-0002-9015-8367

Ryazanov V.A. orcid.org/0000-0003-0903-9561

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 21-76-10014

Final revision received July 11, 2022

doi: 10.15389/agrobiol.2023.4.713eng

Accepted August 15, 2022

Abstract

Dietary bioactives that increase the efficiency of feed nutrient use can provide sustainable and safe livestock products. Some bioactives are modifiers of rumen function in ruminants. These compounds are mostly administered separately. This paper is the first to describe the metabolic changes during *in vitro* incubation of the Kazakh white-headed bull ruminal liquid (RL) with feed compositions (biosubstrates) containing phytopreparations and cobalt chloride. The most effective combinations and dosages of these additives are evaluated. It was found out that *Artemisiae absinthil herba* (2.0 g/kg DM) + CoCl₂ (1.5 mg/kg DM) increases digestibility of feed dry matter (by 2.1 %), the activity of digestive enzymes and the concentration of metabolites in the RL while decreases methane production by 33.9 %. *Salviae folia* (1.6 g/kg DM) + CoCl₂ (1.5 mg/kg DM) provide the maximum reduction in methane emissions (by 46.3 %). Plant preparations increase the activity of RL amylase 2.6-4.0-fold and RL proteases 3.6-fold compared to control. Our goal was to reveal the effect of herbal preparation and cobalt chloride combination on the metabolic changes assessed in RL by *in vitro* technique. The experiments were carried out in 2021 at the BST RAS (Orenburg). Rumen liquid (RL) was sampled from four Kazakh white-headed bulls (*Bos taurus taurus*) weighing 250-265 kg at the age of 9-10 months. The samples were collected 12 h after feeding, through a chronic rumen fistula. The control ration (variant I) was 70 % coarse feed (mixed meadow hay) and 30 % concentrated feed (crushed barley). Test rations II was added with CoCl₂ (1.5 mg/kg DM; OOO NPK Ascont+, Russia), III with *Salviae folia* (1.6 g/kg DM), IV with *Artemisiae absinthil herba* (2.0 g/kg DM), V with *Salviae folia* (1.6 g/kg DM) + CoCl₂ (1.5 mg/kg DM), and VI with *Artemisiae absinthil herba* (2.0 g/kg DM) + CoCl₂ (1.5 mg/kg DM). Each RL sample was tested 4-fold ($n = 16$). Feed samples weighing 500 mg in polyamide bags were incubated for 48 h at 39.5 °C in a mixture of buffer solution with RL. At the end of incubation, the samples were rinsed and dried at 60 °C to a constant mass. The coefficient of digestibility *in vitro* of dry matter was calculated. Air samples were taken separately from each container to determine the methane content by gas chromatography (a Crystallux-2000M device, OOO NPF Meta-chrome, Russia). The amount of volatile fatty acids (VFA) in the RL was determined by gas chromatography with flame ionization detection (a gas Crystallux-4000M chromatograph). The concentration of various forms of nitrogen was determined by the Kjeldahl method (the Millab company equipment, Italy). Amylase activity was measured by Smith-Roy method modified by Anosone for high activity enzymes in the pancreatic juice. Proteolytic activity was assessed colorimetrically ($\lambda = 450$ nm) by destruction of Hammarsten Grade casein. The dry matter of biosubstrates was determined by drying to a constant mass at 60 °C. It was found that *Salviae folia* and *Artemisiae absinthil herba* shifted the fermentation during incubation towards propionate and butyrate. *A. absinthil herba* increased the intensity of nitrogen metabolism in RL during incubation, while total nitrogen content increased by 11.6 %, non-protein nitrogen by 144.3 %, ammonia by 71.4 %, and urea by 31.7 % ($p < 0.05$). Phytomaterials significantly increased the activity of amylase, proteases, and the concentration of VFA, but also increased the methane emission. Combinations of phytomaterials and cobalt chloride had a positive effect on the fermentation processes in the "artificial rumen". The maximum effect was revealed when using *A. absinthil herba* and cobalt chloride. There was an increase in the digestibility of dry matter with a decrease in methane formation by 2.1 %, and an increase in the activity of digestive enzymes and the volatile fatty acid concentration.

Keywords: *Artemisiae absinthil herba*, *Salviae folia*, phytobiotics, cobalt chloride, nitrogen, volatile fatty acids, methane, digestive enzymes, "artificial rumen", beef cattle.