

Кормовые добавки

УДК 636.2:636.085.8:579

doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1144rus

**МИКРОБИОМ РУБЦА И ПРОДУКТИВНОСТЬ ДОЙНЫХ КОРОВ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭНТЕРОСОРБЕНТА МИКОТОКСИНОВ
ЗАСЛОН®-ФИТО***Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ¹, Л.А. ИЛЬИНА¹, Г.Ю. ЛАПТЕВ¹, С.Ю. ЗАЙЦЕВ²

Одна из глобальных проблем, возникающих вследствие развития нежелательной микрофлоры в консервированных кормах, — накопление токсинов. Так, микотоксины (вторичные метаболиты микроорганизмов) подавляют иммунную систему, нарушают работу рубца, кишечника, печени, почек, репродуктивной и нервной системы коров, что приводит к преждевременной выбраковке животных. Модификация сорбентов натуральными эфирными маслами может способствовать восстановлению микробиома рубца коров, нарушенного вследствие воздействия токсинов. В представленной работе нами впервые показано, что применение в рационах коров препарата Заслон®-Фито (ООО «БИОТРОФ», Россия) — комплексного энтеросорбента на основе диатомита, обогащенного эфирными маслами, оказывает положительное влияние на состояние здоровья и продуктивность дойных коров. Продемонстрировано влияние указанной кормовой добавки на изменения в структуре микрофлоры содержимого рубца дойных коров. Цель работы состояла в выявлении особенностей влияния энтеросорбента фитобиотика Заслон®-Фито на состав микробиома рубца у дойных коров (*Bos taurus taurus*), биохимические показатели крови и продуктивности. Научно-хозяйственные испытания проводили в АО ПЗ «Пламя» (Гатчинский р-н, Ленинградская обл.) в 2017 году. Из коров черно-пестрой голштинизированной породы 2-3-й лактации по принципу аналогов были сформированы две группы (опытная и контрольная) по 15 гол. в каждой. Коровы контрольной группы получали основной рацион. Заслон®-Фито вводили в рацион животных опытной группы, смешивая с комбикормом из расчета 20 г · гол.⁻¹ · сут.⁻¹. По завершении эксперимента у коров отбирали пробы химуса рубца. Суммарную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва). Микроорганизмы идентифицировали методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). Кровь отбирали натощак в утреннее время и анализировали по стандартным методикам. У всех животных определяли показатели молочной продуктивности. Установлено, что корма содержали афлатоксины (9 мкг/кг; выше ПДК в 2,4 раза), зеараленон (264 мкг/кг; выше ПДК в 2,6 раз) и дезоксиниваленон (310 мкг/кг; при ПДК в 1000 мкг/мл). Применение препарата Заслон®-Фито способствовало повышению среднесуточного удоя молока на 5,5 % на 1 гол. (до 1,8 кг), уменьшалось содержание афлатоксина M₁ (на 16 %) ($p \leq 0,05$) и количества соматических клеток (на 30 %) ($p \leq 0,05$) в молоке у коров опытной группы по сравнению с контрольными животными. В крови коров из опытной группы наблюдалась тенденция к оптимизации количества общего белка, у животных контрольной группы было выявлено снижение содержания глюкозы (до нижней грани нормы). В опытной группе зафиксировали увеличение количества неорганического фосфора по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Численность грибов-хитридиомицетов (класс *Neocallimastigales*) и архей в рубце коров, получавших с рационом Заслон®-Фито, не изменялась при том, что абсолютная численность бактерий повышалась до $1,25 \times 10^{11} \pm 5,43 \times 10^9$ экв. геномов/г. Положительный эффект препарата Заслон®-Фито был обусловлен его многофункциональным действием на организм. Таким образом, использование энтеросорбента Заслон®-Фито в рационах дойных коров из расчета 20 г · гол.⁻¹ · сут.⁻¹ позволяет снизить риски пагубного влияния микотоксинов кормов, улучшить производственные показатели и качество получаемой продукции.

Ключевые слова: неидентифицируемые бактерии рубца, микотоксины, энтеросорбент, крупный рогатый скот, T-RFLP-анализ.

Проблема поражения корма токсинами плесневых грибов остается одной из наиболее актуальных для молочного животноводства, поскольку микотоксины снижают резистентность организма, вызывают метаболические расстройства, проблемы с пищеварением, нервной системой, ухудшают воспроизводительные функции и повышают вероятность аборт (1). Однако исследования, посвященные влиянию микотоксинов на здоровье и зоотехнические показатели коров, ограничены (2, 3). Одним из

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-016-00207.

наиболее проблемных заболеваний у КРС считается афлатоксикоз, который связан с патологией печени и почек, с риском канцерогенеза.

Микотоксины в рубце КРС метаболизируются с образованием других токсичных соединений. Так, афлатоксин В₁ распадается до афлатоксинола (4), который не менее токсичен, чем его предшественник. Оставшаяся часть афлатоксина В₁ всасывается в желудочно-кишечном тракте посредством пассивной диффузии и гидроксилируется в печени до афлатоксина М₁ (5). Остатки афлатоксина М₁ в молоке составляют 1-6,2 % от количества потребленного афлатоксина В₁ (1, 6, 7). Афлатоксин М₁ устойчив к воздействию высоких температур и не разлагается при пастеризации молочной продукции. Наибольшее поступление афлатоксина из корма в молоко характерно для высокопродуктивных коров на пике лактации (7).

Применяемые в настоящее время сорбенты обладают рядом негативных свойств: способностью десорбировать микотоксины, связывать и выводить из организма незаменимые биоактивные вещества (БАВ) — микро- и макроэлементы, витамины и другие питательные вещества. Кроме того, нормы их включения в рацион весьма высоки (до 20-30 кг/т корма). В связи с этим актуален поиск новых сорбентов, не имеющих таких недостатков.

В опытах *in vitro* была показана, достаточно высокая степень сорбции диатомитом афлатоксина В₁, афлатоксина М₁, стеригматоцистина, Т-2 токсина, зеараленона и охратоксина А (8). При этом степень сорбции афлатоксина В₁ составляла 100 %. На 160 бройлерах в возрасте от 1 до 42 сут оценивали эффективность применения диатомита на фоне кормов, в значительной степени пораженных афлатоксином В₁ (9). При использовании диатомита масса тела птицы увеличивалась на 9,5 %, потребления корма — на 7,4 %, содержание альбумина в сыворотке крови — на 22,6 %, активность лактатдегидрогеназы — на 44,4 %. Несмотря на ряд полезных свойств диатомита, эксперименты, демонстрирующие его влияние на сорбцию микотоксинов в кормах жвачных, ранее не проводились.

Натуральные кормовые добавки — эфирные масла также популярны в качестве замены антибиотиков в животноводстве (10). Эфирные масла представляют собой разнообразные БАВ, обладающие широким спектром действия (11-13). Перспективность их использования в животноводстве связана с доказанной способностью повышать резистентность, подавлять нежелательную микрофлору, стимулировать секрецию пищеварительных ферментов и кровообращение, проявлять антиоксидантное действие, улучшать усвоение полезных нутриентов корма (14, 15). Предполагается, что эфирные масла способны положительно воздействовать на белковый обмен и сокращать производство аммиака в рубце (16, 17).

В представленной работе нами впервые показано, что применение в рационах комплексного энтеросорбента Заслон®-Фито на основе диатомита, обогащенного эфирными маслами, положительно влияет на состояние здоровья и продуктивность дойных коров. Впервые продемонстрировано действие этой кормовой добавки на структуру микрофлоры в содержимом их рубца.

Цель работы — выявление особенностей влияния энтеросорбента фитобиотика Заслон®-Фито на состав микробиома рубца, биохимические показатели крови и продуктивность дойных коров (*Bos taurus taurus*).

Методика. Научно-хозяйственные испытания проводили в АО ПЗ «Пламя» (Гатчинский р-н, Ленинградская обл.) в 2017 году. По принципу аналогов были сформированы две группы (опытная и контрольная) дойных коров черно-пестрой голштинизированной породы 2-3-й лактации

(по 15 гол. в каждой группе). Коровы содержались на привязи. На начало эксперимента все животные были клинически здоровы, находились в одинаковых условиях кормления и содержания. Всего коровы получали 38,0 кг натурального корма, что соответствовало 10,8 МДж обменной энергии (ОЭ) в сухом веществе (СВ). Продолжительность опыта — 71 сут. Коровы контрольной группы получали основной рацион. Заслон®-Фито (ООО «БИО-ТРОФ», Россия) вводили в основной рацион животных опытной группы, смешивая с комбикормом из расчета 20 г · гол.⁻¹ · сут.⁻¹.

Образцы объемистых кормов отбирали в трех повторностях с помощью пробоотборника с соблюдением асептики. Глубина погружения пробоотборника в траншею составляла 1 м. Микотоксины, кроме дезоксиниваленол (ДОН), экстрагировали из проб кормов 70 % метанолом, ДОН — дистиллированной водой.

Кровь для анализа брали в утреннее время натошак и анализировали по стандартным методикам. У всех животных определяли показатели молочной продуктивности. По завершении эксперимента с использованием стерильного зонда брали пробы химуса рубца, которые хранили при температуре –20 °С до проведения молекулярно-биологических исследований.

Массовую долю жира в молоке определяли по ГОСТ 5867-90, белок молока — согласно ГОСТ 23327-98. Содержание в молоке соматических клеток устанавливали с использованием прибора СОМАТОС (ООО ВПК «Сибагроприбор», Россия).

Содержание микотоксинов в кормах и молоке оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением тест-систем AgraQuant («Romer Labs, Inc.», Австрия) согласно прилагаемым протоколам.

Для ИФА-анализа экстракт образца корма или молока (либо стандарты) и конъюгированные с ферментом микотоксины смешивали, помещали в микролуночки с антителами, промывали и вносили ферментный субстрат. Интенсивность окрашивания субстрата была обратно пропорциональна содержанию микотоксина в образце или стандарте. Затем вносили остановочные растворы — 10 % соляную кислоту (при анализе зеараленона и Т-2 токсина) и 10 % фосфорную кислоту (для других микотоксинов). Оптическую плотность определяли при $\lambda = 450$ нм на микростриповом фотометре StatFax 303+ («Awareness Technology, Inc.», США), сравнивая результаты для образца и стандартов.

Суммарную ДНК из проб химуса выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва). Микроорганизмы идентифицировали методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). При ПЦР-амплификации использовали термоциклер Махуген («Life Technologies, Inc.», США) и праймеры для фрагмента гена 16S рРНК, содержащими на 5'-конце флуорофор Sy5 («Бигль», Россия): 63f (5'-CAG-GCCTAACACATGCAAGTC-3'), 1492r (5'-TACGGHTACSTTGTTACGACTT-3') (бактерии), A109f (5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'), A934r (5'-GTGC-TCCCCGCCAATTCCT-3') (археи); режим амплификации — 3 мин при 95 °С; 30 с при 95 °С, 30 с при 55 °С, 60 с при 72 °С (35 циклов); 60 с при 72 °С.

Ампликоны, несущие флуоресцентную метку, очищали по стандартной методике (18) и проводили реакцию рестрикции (30-50 нг) с применением ферментов HaeIII, HhaI и MspI, следуя инструкции фирмы-производителя («Fermentas», Литва). Продукты реакции подвергали анализу с помощью SEQ 8000 («Beckman Coulter», США). Таксономическую принадлежность микроорганизмов определяли в программе Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>). Общую численность

бактерий, *Archaea* и микромицетов класса *Neocallimastigales* учитывали методом количественной ПЦР с использованием набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (ЗАО «Синтол», Россия) и праймеров F — 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', R — 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (бактерии), F — 5'-AGGAATTG-GCGGGGAGCAC-3', R — 5'-GCCATGCACCWCCTCT-3' (*Archaea*), F — 5'-GCACTTCATTGTGTGTACTG-3', R — 5'-GGATGAACTCGTTGACT-TC-3' (грибы) на детектирующем термоциклере ДТ Lite-4 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в следующем режиме: 3 мин при 95 °С (1 цикл); 13 с при 95 °С, 13 с при 57 °С, 30 с при 72 °С (40 циклов).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и программы PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>). Определяли средние значения (*M*) и стандартные ошибки средних (\pm SEM). Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

1. Состав рациона дойных коров (*Bos taurus taurus*) черно-пестрой голштинизированной породы в контрольной и опытной группах (АО ПЗ «Пламя», Гатчинский р-н, Ленинградская обл., 2017 год)

Ингредиент, показатель	Контроль	Опыт
Комбикорм К60-1-89, кг	12,0	12,0
Кукуруза, кг	1,0	1,0
Жмых, кг	0,5	0,5
Сено, кг	2,0	2,0
Силос, кг	20,0	20,0
Жом свекловичный, кг	0,5	0,5
Меласса, кг	1,5	1,5
Минвит®-3-1 Se, кг	0,2	0,2
Поваренная соль, г	70,0	70,0
Пропиленгликоль, кг	0,25	0,25
Сорбент Заслон®-Фито, г · гол. ⁻¹ · сут ⁻¹	—	20,0
Общие элементы питания:		
кормовые единицы, корм. ед.	23,41	23,41
ОЭ, МДж	259,09	259,09
сухое вещество, кг	22,08	22,08
сырой протеин, г	4057,1	4057,1
РП, г	370,21	370,21
НРП, г	146,89	146,89
ПП КРС, г	3103,9	3103,9
сырой жир, г	1214,1	1214,1
сырая клетчатка, г	3590,6	3590,6
НДК, г	1605,0	1605,0
крахмал, г	3044,5	3044,5
сахар, г	1954,4	1954,4
БЭВ, г	2802,0	2802,0

Примечание. ОЭ — обменная энергия, РП — расщепляемый протеин, НРП — нерасщепляемый протеин, ПП КРС — переваримый протеин крупного рогатого скота, НДК — нейтрально-детергентная клетчатка, БЭВ — безазотистые экстрактивные вещества. Прочерк означает, что компонент не входил в состав рациона.

Результаты. Заслон®-Фито — это кормовая добавка, состоящая из минерального носителя органического происхождения (диатомита) и смеси эфирных масел. Высокое содержание пористого кремнезема (около 90 %) в аморфном виде дает высокую удельную площадь поверхности (до 40 га/кг) и, как следствие, значительную сорбционную емкость. На диатомит была нанесена смесь эфирных масел карвакрола, тимола, лимонена, линалоола, цитраля, алицилина, сальвина, цинеола, линолевой кислоты для придания дополнительных фитобиотических свойств. Содержание смеси эфирных масел в готовом препарате на основе диатомита составляло 0,5 %.

Состав основного рациона, который потребляли коровы, представлен в таблице 1. Используемые в работе корма были пораже-

ны афлатоксинами (АФЛА) в количестве 9 мкг/кг (выше ПДК в 2,4 раза), зеараленоном (ЗЕН) (264 мкг/кг, выше ПДК в 2,6 раз) и ДОН (310 мкг/кг при ПДК 1000 мкг/мл) (табл. 2).

Применение препарата Заслон®-Фито в течение 71 сут способствовало повышению среднесуточного удоя натурального молока на 1 гол. на 5,5 % относительно контрольной группы ($p \leq 0,05$) (до 1,8 кг) (табл. 2). Аналогичная закономерность наблюдалась и при пересчете данных на молоко 4 % жирности (см. табл. 2). В этом случае суточный удой молока увеличивался на 8,4 % ($p \leq 0,05$), или на 2,7 кг/гол. Содержание жира и

белка в молоке у коров опытных групп имело тенденцию к увеличению (соответственно на 2,6 % и 3,0 %) по сравнению с аналогичными показателями у коров контрольной группы (различия статистически незначимы).

2. Содержание микотоксинов (мг/кг сухого вещества) в некоторых компонентах кормов для дойных коров (*Bos taurus taurus*) черно-пестрой голштинизированной породы (АО ПЗ «Пламя», Гатчинский р-н, Ленинградская обл., 2017 год)

Микотоксин	Комбикорм		Кормосмесь с кормового стола		Силос		Сено	
	мг/кг	отношение к ПДК	мг/кг	отношение к ПДК	мг/кг	отношение к ПДК	мг/кг	отношение к ПДК
АФЛА	0,0038	н.п.	0,0063	> в 1,58 раза	0,8400	> в 2,10 раза	0,7200	> в 1,80 раза
ОТА	0,002	н.п.	0,0017	н.п.	—	н.п.	—	н.п.
T-2	0,0795	> в 1,33 раза	0,07	> в 1,17 раза	0,0360	н.п.	0,0042	н.п.
ЗЕН	0,0401	н.п.	0,0225	н.п.	0,1087	> в 1,09	0,0387	н.п.
ДОН	2,1	> в 2,10 раза	1,5	> в 1,50 раза	2,1	> в 2,10 раза	1,7	> в 1,70 раза

Примечание. АФЛА — сумма афлатоксинов в рубце, ОТА — охратоксин А, T-2 — T-2 токсин, ЗЕН — зеараленон, ДОН — дезоксиниваленон; ПДК — предельно-допустимая концентрация. ПДК приведены согласно требованиям комиссии Таможенного союза. (19), н.п. — не превышало ПДК. Прочерки означают, что микотоксин не обнаружен.

К основным выявленным положительным эффектам применения Заслон®-Фито относится заметное уменьшение содержания афлатоксина M₁ (на 16 %) ($p \leq 0,05$) и количества соматических клеток (на 30 %) ($p \leq 0,05$) в молоке у коров опытной группы по сравнению с контрольными животными. При этом содержание сухого обезжиренного остатка и лактозы практически не изменялось во всех группах (табл. 3).

3. Молочная продуктивность и биохимический состав молока у дойных коров (*Bos taurus taurus*) черно-пестрой голштинизированной породы при введении в рацион фитобиотика Заслон®-Фито ($M \pm SEM$, АО ПЗ «Пламя», Гатчинский р-н, Ленинградская обл., 2017 год)

Показатель	Контроль ($n = 15$)	Опыт ($n = 15$)
Суточный удой натурального молока, кг	32,8±0,6	34,6±0,5**
Суточный удой молока 4 % жирности, кг	31,5±0,6	34,2±0,5
Белок, %	3,2±0,1	3,3±0,1
Жир, %	3,8±0,1	3,9±0,1
АФЛАМ1, нг/кг	47,3±2,4	39,8±1,1**
Количество соматических клеток, тыс/см ³	239±8	169±8*
Мочевина, мг/100 мл	27,6±1,3	26,1±0,9
Сухой обезжиренный остаток, %	8,7±0,2	8,8±0,1
Лактоза, %	4,8±0,1	4,8±0,2

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика»; АФЛАМ1 — афлатоксин M₁.

*, ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,001$ и $p \leq 0,05$.

4. Биохимические показатели крови у дойных коров (*Bos taurus taurus*) черно-пестрой голштинизированной породы при введении в рацион фитобиотика Заслон®-Фито (АО ПЗ «Пламя», Гатчинский р-н, Ленинградская обл., 2017 год)

Показатель	Контроль ($n = 5$)	Опыт ($n = 5$)	Норма
Белок общий, г/л	90,1±4,30	86,1±4,10	72,0-86,0
Билирубин общий, мкмоль/л	1,7±0,07	1,7±0,08	0,2-5,10
Глюкоза, ммоль/л	2,4±0,09	3,4±0,18*	2,2-3,30
Кальций, ммоль/л	2,2±0,08	2,2±0,12	2,5-3,13
Кетоновые тела	н.о.	н.о.	н.о.
Мочевина, ммоль/л	3,9±0,23	3,9±0,20	3,3-6,70
Резервная щелочность, об.% CO ₂	54,0±2,50	56,0±2,70	46-66
Фосфор, ммоль/л	1,6±0,05	2,1±0,10*	1,5-1,94

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика»; н.о. — не обнаружены.

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

Снижение содержания в молоке коров АФЛАМ1 может свидетельствовать о выведении афлатоксина В1 из их организма, поскольку ранее

сообщалось о достаточно быстрой абсорбции афлатоксикола (метаболита афлатоксина В₁) и афлатоксина М₁ в организме, вследствие чего они, как правило, уже через несколько часов детектируются в молоке (20). Максимальная концентрация этих веществ в молоке наблюдается через 1 сут после поедания животными пораженного корма (1).

В биохимическом анализе крови у коров опытной группы по сравнению с контролем отмечалась тенденция к оптимизации количества общего белка (табл. 4). Отклонения в содержании общего белка регистрируются при метаболических расстройствах и заболеваниях печени (21). Поэтому отклонение этого показателя от референсных значений у контрольных животных могло быть связано с пагубным влиянием токсинов на организм (см. табл. 4).

В крови у коров контрольной группы выявили уменьшение содержания глюкозы (до нижней границы нормы). Данные достоверно различались между контрольной и опытной группами ($p \leq 0,05$). Известно, что многие заболевания коров, в том числе кетоз, характеризуются пониженным содержанием глюкозы в организме в связи с нарушением обмена углеводов, запасов гликогена в мышцах и печени (22).

В группе коров, в рацион которых вводили сорбент, было зафиксировано увеличение количества неорганического фосфора по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$) (см. табл. 4). Известно (21), что его содержание в крови может служить индикатором состояния обменных процессов.

5. Состав микрофлоры (%) рубца (по данным T-RFLP-анализа) у дойных коров (*Bos taurus taurus*) черно-пестрой голштигизированной породы при введении в рацион фитобиотика Заслон[®]-Фито ($M \pm SEM$, АО ПЗ «Пламя», Гатчинский р-н, Ленинградская обл., 2017 год)

Микроорганизмы	Контроль ($n = 3$)	Опыт ($n = 3$)
Сем. <i>Eubacteriaceae</i>	2,0±0,08	3,72±0,19**
Пор. <i>Selenomonadales</i>	5,7±0,16	8,5±0,38**
Сем. <i>Bacillaceae</i>	9,1±0,35	10,6±0,42
Сем. <i>Bifidobacteriaceae</i>	0,5±0,05	0,7±0,05**
Сем. <i>Lactobacillaceae</i>	2,5±0,11	1,3±0,15**
Сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	5,4±0,26	1,1±0,06*
Сем. <i>Clostridiaceae</i>	9,7±0,71	6,5±0,42**
<i>Staphylococcus</i> sp. и <i>Fusobacterium</i> sp.	4,6±0,18	3,9±0,24
Неидентифицированные филоциты:	19,0±0,95	37,9±1,57*
158 п.н.	0,1±0,01	1,1±0,05*
202 п.н.	0,8±0,09	1,6±0,27
225 п.н.	1,5±0,29	н.п.д.о.
226 п.н.	н.п.д.о.	0,9±0,06
425 п.н.	0,1±0,02	0,6±0,07**
433 п.н.	н.п.д.о.	0,9±0,09
440 п.н.	0,2±0,01	0,4±0,03**
463 п.н.	5,5±0,34	21,6±0,98*
576 п.н.	0,6±0,04	2,2±0,18**
Прочие	1,8±0,12	1,5±0,08

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика»; н.п.д.о. — ниже предела достоверного определения.

*, ** Различия с контролем статистически значимы соответственно при $p \leq 0,001$ и $p \leq 0,05$.

Под влиянием сорбента происходило выраженное изменение состава микрофлоры в рубце коров (табл. 5). В опытной группе значительно увеличивалась доля ЛЖК-синтезирующих бактерий порядка *Selenomonadales* (на 49 %) ($p \leq 0,05$), образующих уксусную кислоту и другие летучие жирные кислоты (ЛЖК) (23, 24). Это объясняет данные о повышении жира в молоке у животных, которым скармливали Заслон[®]-Фито, поскольку уксусная кислота — предшественник молочного жира. В то же время у животных в опытной группе по сравнению с контрольной снижалось количество синтезирующих молочную кислоту бактерий порядка *Lac-*

tobacillales ($p \leq 0,05$), которые обладают способностью разлагать моносахара в рубце до лактата. Высокое содержание лактобактерий нередко ассоциировано с закислением рубца, снижением доли бактерий, синтезирующих целлюлазы, нарушением усвоения животными растительных кормов и лактатным ацидозом (23-25).

По мнению ряда исследователей, коррекция соотношения лактатутилизирующих и лактат-продуцирующих бактерий может способствовать снижению риска развития лактатного ацидоза. Так, при скармливании коровам бактерий порядка *Selenomonadales* наблюдалось повышение pH содержимого рубца и снижение концентрации молочной кислоты во время быстрого перехода на высококонцентратный рацион (26).

Контроль количества лактат-продуцирующих бактерий в рубце жвачных можно осуществлять при добавлении в рацион антибиотиков (26). Помимо этого, для профилактики лактатного ацидоза и повышения продуктивности животных, в рацион КРС часто включают пробиотики. В настоящее время описан ряд пробиотических препаратов, имеющих различные механизмы действия. Часто в качестве пробиотиков используют микроорганизмы, стимулирующие рост лактат-утилизирующих бактерий (27). Положительные результаты при использовании в качестве пробиотика бактерий *Megasphaera elsdenii*, утилизирующих лактат, были описаны N.A. Elam с соавт. (28). Основное ограничение к использованию в качестве пробиотика лактат-утилизирующих бактерий *Megasphaera elsdenii* — необходимость строгого анаэробнозиса для поддержания жизнеспособной культуры. Тем не менее подобные многообещающие результаты в профилактике лактатного ацидоза служат стимулом для дальнейших исследований.

В нашей работе в опытной группе животных происходило снижение содержания *Staphylococcus* sp. и *Fusobacterium* sp., среди которых нередко встречаются возбудители воспалительных заболеваний, в том числе мастита. Возможно, это приводило к оздоровлению эпителия вымени, устранению возможных очагов воспаления и уменьшению количества соматических клеток в молоке, которое мы наблюдали. Ранее другими авторами был показан положительный эффект эфирных масел растений у животных вследствие антимикробного действия, которое может приводить к изменению процессов ферментации в рубце (17). По антимикробным свойствам большинство эфирных масел напоминает ионофоры, при этом они избирательно ингибируют грамположительные бактерии. Причины избирательности аналогичны таковым у ионофорам — гидрофобный характер эфирных масел позволяет им взаимодействовать с бактериальной мембраной, изменяя транспорт ионов через мембрану (17). Такая селективность — основное свойство ионофоров, что объясняет понижение количества грамположительных бактерий, продуцирующих лактат, и увеличение содержания грамотрицательных бактерий, образующих пропионат (26). Учитывая сходство эфирных масел и ионофоров с точки зрения избирательности и механизма действия, можно было ожидать, что одним из главных эффектов эфирных масел будет сдвиг пропорций ЛЖК в рубце. Тем не менее ряд исследователей сообщали, что так происходит не всегда: эфирные масла или не влияли на количество ЛЖК в рубце (29), или способствовали увеличению либо понижению количества пропионата (30). При этом степень влияния эфирных масел на концентрацию ряда ЛЖК в рубце в значительной степени зависела от рациона, количества и вида эфирных масел. Кроме того, за счет ингибирования лактат-продуцирующих бактерий ионофоры, как правило, уменьшают риск возникновения лактатного ацидоза. Ионофоры также снижают синтез аммиака в рубце, что, в свою очередь,

приводит к более эффективному использованию белка кормов и сокращению эмиссии метана (31).

Уменьшение количества мочевины в молоке коров, получавших Заслон®-Фито, могло иметь косвенную связь с регуляцией состава микрофлоры рубца, в частности с оптимизацией численности простейших, синтезирующих протеазы. Известно (23), что белковая фракция кормов под влиянием микрофлоры, прежде всего простейших, расщепляется в рубце до аммония и затем превращается в микробный белок, что положительно сказывается на физиологии животных. Оставшийся аммиак транспортируется в печень, где трансформируется в мочевину, которая выводится с мочой. Часть мочевины возвращается обратно в рубец. При дисбиозах рубца значительная часть белка кормов преобразуется через аммиак в мочевину, в результате чего наблюдается недополучение белка.

Также установлено, что ионофоры оказывают воздействие на анаэробные грибы рубца (32, 33). R. Elliott с соавт. (32) предположили, что увеличение концентрации пропионовой кислоты в рубце может быть связано с антифунгальным, а не антибактериальным действием ионофоров. В наших исследованиях изменения численности грибов-хитридиомицетов класса *Neocallimastigales* и архей в рубце у коров, получавших с рациона Заслон®-Фито не изменялось относительно контроля (соответственно $3,22 \times 10^7 \pm 9,17 \times 10^4$ и $3,21 \times 10^8 \pm 1,42 \times 10^6$ экв. геномов/г). При этом применение фитобиотика приводило к увеличению абсолютной численности бактерий до $1,25 \times 10^{11} \pm 5,43 \times 10^9$ экв. геномов/г.

Таким образом, применение препарата Заслон®-Фито способствовало повышению среднесуточного удоя молока на 5,5 % и снижало в нем содержание афлатоксина M₁ (на 16 %) ($p \leq 0,05$) и количество соматических клеток (на 30 %) ($p \leq 0,05$). В крови коров из опытной группы уровень глюкозы был выше, возрастало количество неорганического фосфора ($p \leq 0,05$). Следовательно, применение сорбента токсинов Заслон®-Фито в рационах дойных коров в количестве 20 г · гол.⁻¹ · сут.⁻¹ позволяет минимизировать негативный эффект от токсинов кормов, улучшить зоотехнические показатели и повысить уровень гигиены кормов. Положительный эффект может быть обусловлен многофункциональным действием препарата на организм коров, в числе которых высокая сорбция микотоксинов и регуляция микробиоты рубца эфирными маслами.

¹ООО «БИОТРОФ+»,

192284 Россия, г. Санкт-Петербург, Загребский бульвар, д. 19, корп. 1,
e-mail: ilina@biotrof.ru ✉, deniz@biotrof.ru, laptev@biotrof.ru;

²ФГБНУ ФНИЦ животноводства —

ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,

142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: s.y.zaitsev@mail.ru

Поступила в редакцию

4 июня 2019 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 6, pp. 1144-1153

INFLUENCE OF ZASLON®-FITO ENTEROSORBENT OF MYCOTOXINS ON RUMEN MICROBIOME AND PRODUCTIVITY OF DAIRY COWS

E.A. Yildirim¹, L.A. Ilina¹, G.Yu. Laptev¹, S.Yu. Zaitsev²

¹JSC «Biotrof+», 19 corp. 1, Zagrebkii bulv., St. Petersburg, 192284 Russia, e-mail ilina@biotrof.ru (✉ corresponding author), deniz@biotrof.ru;

²Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail s.y.zaitsev@mail.ru

ORCID:

Yildirim E.A. orcid.org/0000-0002-5846-5105

Ilina L.A. orcid.org/0000-0003-2789-4844

The authors declare no conflict of interests

Laptev G.Yu. orcid.org/0000-0002-8795-6659

Zaitsev S.Yu. orcid.org/0000-0003-1533-8680

Abstract

One of the global problems arising from the extension of opportunistic microflora in canned foods is toxin accumulation. Mycotoxins, the secondary metabolites of micromycetes, suppress immune system, disrupt the functioning of the rumen, intestines, liver, kidneys, reproductive and nervous system of cows, which leads to premature cow disposal. When developing preventive measures to increase the safety level of feed of own procurement, it should be borne in mind that the basis of the modern concept of control pathogens and their toxins is the use of natural environmentally friendly technologies. Modification of sorbents with natural essential oils can help restore the cows' rumen microbiome disrupted due to the toxins impact. The article presents the results of a study of unidentifiable rumen microorganisms in cattle by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. The purpose of the study was to identify the effects of a phytobiotic enterosorbent Zaslón®-Fito on the composition of rumen microbiome, blood biochemical parameters and productivity. Farm test of Zaslón®-Fito enterosorbent was carried out on dairy cows (AO PZ "Plamya", Leningrad Province, Gatchina District). Two groups of dairy black and white mottled Holstein cows (*Bos taurus taurus*) of the 2-3rd lactation were formed, 15 animals in each group, for a 71-day experiment. The enterosorbent Zaslón®-Fito was added to the diet by mixing with feed, 20 g per animal per day. At the first step of the investigation, the ELISA method showed that these feeds were contaminated with aflatoxins (9 µg/kg, or 2.4 times higher than the maximum permissible concentration), zearalenone (264 µg/kg, or 2.6 times higher than MPC), and deoxynivalenol (310 µg/kg, MPC = 1000 µg/ml). The use of Zaslón®-Fito had a pronounced positive effect on the milk productivity of cows with a 5.5 % increase in the average daily milk yield per 1 animal (up to 1.8 kg). Analysis of the main biochemical parameters of dairy cows' blood as influenced by Zaslón®-Fito detected a tendency to total protein level optimization; in the control animals there was a decrease in glucose concentration (to the lower limit), and in the experimental group, we found out an increase in the amount of inorganic phosphorus compared to the control ($p \leq 0.05$). The counts of chytridiomycetes (class *Neocallimastigales*) and archaea in the rumen of cows fed dietary Zaslón®-Fito additive did not change, while the absolute number of bacteria increased to $1.25 \times 10^{11} \pm 5.43 \times 10^9$ genome equivalent per gram. Thus, our investigation shows that Zaslón®-Fito as the dietary additive has a direct positive impact on the animal health and productivity. This is due to multifunctional properties of Zaslón®-Fito, including both high adsorption of mycotoxins and regulation of the rumen microbiota due to some essential oils contained in the composition. The use of enterosorbent Zaslón®-Fito in the diet of dairy cows at the daily rate of 20 g per animal can reduce the risks of the harmful effects of feed mycotoxins and improve the production performance and the quality of the obtained products.

Keywords: unidentifiable rumen bacteria, mycotoxins, enterosorbent, cattle, T-RFLP analysis.

REFERENCES

1. Diaz D.E., Hagler W.M. Jr., Blackwelder J.T., Eve J.A., Hopkins B.A., Anderson K.L., Jones F.T., Whitlow L.W. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, 2004, 157(2): 233-241 (doi: 10.1023/B:MYCO.0000020587.93872.59).
2. Driehuis F. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 2013, 22(1): 16-34 (doi: 10.23986/afsci.6699).
3. Gallo A., Giuberti G., Frisvad J.C., Bertuzzi T., Nielsen K.F. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(8): 3057-1111 (doi: 10.3390/toxins7083057).
4. Trucksess M.W., Richard J.L., Stoloff L., McDonald J.S., Brumley W.C. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in blood and milk of cows given aflatoxin B₁. *American Journal of Veterinary Research*, 1983, 44(9): 1753-1756.
5. Kuilman M.E.M., Maas R.F.M., Judah D.J., Gremmels J. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B₁. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2707-2713 (doi: 10.1021/jf980062x).
6. Diaz D. *Mikotoksiny i mikotoksikozy* [Mycotoxins and mycotoxicoses]. Moscow, 2006 (in Russ.).
7. Veldman A., Meijst J.A.C., Borggreve G.J., Heeres-van der Tol J.J. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Science*, 1992, 55(2): 163-168 (doi: 10.1017/S0003356100037417).
8. Natour R.M., Yousef S.M. Adsorption efficiency of diatomaceous earth for mycotoxin. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*, 1998, 16(1): 113-127.
9. Modirsanei M., Mansoori B., Khosravi A.R., Kiaei M.M., Khazraenia P., Farkhoy M., Masoumi Z. Effect of diatomaceous earth on the performance and blood variables of broiler chicks during experimental aflatoxicosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(4): 626-632 (doi: 10.1002/jsfa.3127).
10. Simitzis P.E., Deligeorgis S.G. The effects of natural antioxidants dietary supplementation on

- the properties of farm animal products. In: *Animal feed: types, nutrition, safety*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011: 155-168.
11. Adil S., Magray S.N. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(6): 873-877 (doi: 10.3923/javaa.2012.873.877).
 12. Jang I.S., Ko Y.H., Kang S.Y., Lee C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 134(3-4): 304-315 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009).
 13. Jamroz D., Wiliczekiewicz A., Wiertelcki T., Orda J., Skorupińska J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *British Poultry Science*, 2005, 46(4): 485-493 (doi: 10.1080/00071660500191056).
 14. Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(Suppl. 14): E140-E148 (doi: 10.2527/jas.2007-0459).
 15. Zeng Z., Zhang S., Wang H., Piao X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 6(1): 7 (doi: 10.1186/s40104-015-0004-5).
 16. McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., Beever D.A., Newbold C.J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 5011-5014 (doi: 10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003).
 17. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos 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).
 18. Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh. *Molekulyarnoe klonirovanie* [Molecular cloning]. Moscow, 1984 (in Russ.).
 19. *Veterinarno-sanitarnye trebovaniya Tamozhennogo soyuza «O primenenii veterinarno-sanitarnykh mer v tamozhennom soyuze»*. Utv. resheniem KTS ot 18.06.2010 № 317 [Veterinary and sanitary requirements of the Customs Union «On the application of veterinary and sanitary measures in the customs union» dated 18.06.2010 № 317].
 20. Polan S.E., Hayes J.R., Campbell T.C. Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1974, 22(4): 635-638 (doi: 10.1021/jf60194a027).
 21. Kazartsev V.V., Ratoshnyi A.N., Kazartsev V.V. *Zootekhnika*, 1986, 3: 323-330 (in Russ.).
 22. Vasil'eva E.A. *Klinicheskaya biokhimiya sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* [Clinical biochemistry of farm animals]. Moscow, 2000: 359 (in Russ.).
 23. Hungate R.E. *The rumen and its microbes*. Academic Press, NY, 1966.
 24. Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* [Methods to study microflora of the digestive tract of farm animals and poultry]. Moscow, 2006 (in Russ.).
 25. Il'ina L.A. *Izuchenie mikroflory rubtsa krupnogo rogatogo skota na osnove molekulyarnobiologicheskogo metoda T-RFLP s tsel'yu razrabotki sposobov ee optimizatsii. Kandidatskaya dissertatsiya* [The study of cattle rumen microflora based on the molecular biological method T-RFLP with the aim of its optimization. PhD Thesis]. St. Petersburg, 2012 (in Russ.).
 26. Nagaraja T.G., Newbold C.J., Van Nevel C.J., Demeyer D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The rumen microbial ecosystem*. P.N. Hobson, C.S. Stewart (eds.). Springer, Dordrecht, 1997: 523-632 (doi: 10.1007/978-94-009-1453-7_13).
 27. Krehbiel C.R., Rust S.R., Zhang G., Gilliland S.E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(14, Suppl. 2): E120-E132 (doi: 10.2527/2003.8114_suppl_2E120x).
 28. Elam N.A., Gleghorn J.F., Rivera J.D., Galvyan M.L., Defoor P.J., Brashears M.M., Younts-Dahl S.M. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(11): 2686-2698 (doi: 10.2527/2003.81112686x).
 29. Meyer N.F., Erickson G.E., Klopfenstein T.J., Greenquist M.A., Luebbe M.K., Williams P., Engstrom M.A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(7): 2346-2354 (doi: 10.2527/jas.2008-1493).
 30. Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 2006, 83(11): 2801-2808 (doi: 10.2527/2005.83112572x).
 31. Guan H., Wittenberg K.M., Ominski K.H., Krause D.O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(7): 1896-1906 (doi: 10.2527/jas.2005-652).
 32. Elliott R., Ash A.J., Calderon-Cortes F., Norton B.W., Bauchop T. The influence of anaerobic fungi on rumen volatile fatty acid concentrations in vivo. *The Journal of Agricultural Science*, 1987, 109(1): 13-17 (doi: 10.1017/S0021859600080928).
 33. Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. Effect of the novel ionophore tetronasin (IC1 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(2): 544-547.