

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290067** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.29

(22) Дата подачи заявки
2016.11.03

(51) Int. Cl. *A23K 10/18* (2016.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)

**(54) РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВ И ПРОДУКЦИИ
МЕТАНА У ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ**

(31) 62/327,616

(32) 2016.04.26

(33) US

(62) 201892404; 2016.11.03

(71) Заявитель:
**ЗЕ СТЕЙТ ОФ ИЗРАИЛ,
МИНИСТРИ ОФ ЭГРИКАЛЧЕ
ЭНД РУРАЛ ДЕВЕЛОПМЕНТ,
ЭГРИКАЛЧЕРАЛ РИСЁЧ
ОРГАНИЗЕЙШН (АРО) (ВОЛКАНИ
СЕНТЕР) (IL)**

(72) Изобретатель:
Мизрахи Ицхак (IL)

(74) Представитель:
**Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)**

(57) Способ определения эффективности использования кормов и продукции метана жвачного животного, предусматривающий анализ числа и/или разнообразия бактериального таксона микробиома животного или содержания генов указанного микробиома, причем число и/или разнообразие указанного таксона ниже заданного уровня является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана, или число генов ниже заданного уровня является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

202290067

A2

A2

202290067

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВ И ПРОДУКЦИИ МЕТАНА У ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

ОПИСАНИЕ

5

Область и уровень техники

Настоящее изобретение, согласно некоторым его вариантам осуществления, относится к микрофлоре рубца и ее применениям. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к микрофлоре рубца для регулирования
10 эффективности использования кормов и продукции метана у жвачных животных.

Жвачные животные представляют огромное значение для человека, поскольку они преобразуют энергию, хранящуюся в полимерах растительной биомассы, которые являются не перевариваемыми для людей, до усвояемых пищевых продуктов. Люди одомашнили этих животных для этой цели в эпоху неолита и с тех пор выращивают их для
15 производства и потребления животного белка в форме мяса и молока. В современных экстенсивных режимах производства жвачные животные потребляют 30% урожая, выращенного на Земле, и занимают еще 30% суши Земли. Кроме того, эти животные выделяют в атмосферу метан – сильнодействующий парниковый газ – и считается, что они отвечают за значительную часть его выбросов за счет антропогенной активности. Одним из
20 способов решения этих проблем является повышение энергетической эффективности животных, т.е. эффективности, с которой они преобразуют энергию из корма, тем самым увеличивая доступность пищи при снижении нагрузки на окружающую среду, так как эти животные будут производить больше, а есть меньше.

Для оценки энергетической эффективности животного используют различные
25 способы; среди них способ остаточного потребления корма (RFI) (Koch *et al.*, 1963) является общепринятым и широко используется, поскольку он является независимым от роста и размера тела и, таким образом, является подходящим для сравнений между животными. Этот параметр представляет собой оценку разницы между фактическим потреблением корма животного и его прогнозируемым потреблением корма на основе его
30 уровня продукции и массы тела. Энергетическая эффективность значительно варьируется между различными особями одной и той же породы. С использованием широких исследований ассоциаций генома обнаружили, что специфические геномные области, такие как одна область генома, которая, как предполагают, ассоциируется с ролью в контроле энергетического метаболизма, коррелируют с эффективностью использования кормов. Тем
35 не менее, только средний генетический компонент (наследуемость в диапазоне от 0,26 до

0,58) влияет на использование энергии, что также продемонстрировали повышением эффективности использования кормов путем селекции животных в соответствии с их RFI.

Одним из важных факторов, которые могут в значительной степени способствовать изменчивостям в эффективности использования кормов этих животных, является микробиом рубца. Способность этих животных переваривать полимеры растительной биомассы объясняется этим сложным микробиомом, который находится в верхних отделах их пищеварительного тракта в отделе, называемом рубец (Mizrahi, 2013). Анаэробная среда в рубце и очень сложные пищевые сети, поддерживаемые микробиомом рубца, обеспечивают ферментацию растительного материала до метаболических конечных продуктов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) и метан. В то время как SCFA абсорбируются через стенку рубца и служат для удовлетворения потребностей животного в энергии, метан не абсорбируется; он выделяется в атмосферу вместе с его сохраненной энергией, тем самым способствуя потере энергии от корма, а также внося вклад в глобальное потепление (Mizrahi, 2011). Сообщали о различиях между животными с высоким и низким RFI в отношении продукции метана, а также некоторых различий в микробиологическом составе (Nkrumah *et al.*, 2006, Mizrahi, 2011, Hernandez-Sanabria *et al.*, 2012, Jami *et al.*, 2014, Kittelmann *et al.*, 2014, Shi *et al.*, 2014, Wallace *et al.*, 2015). Тем не менее, всестороннее и полное понимание профилей структуры микробиома и того, как их преобразовать в функциональность на уровне животного по-прежнему отсутствует.

Сущность изобретения

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов и продукции метана жвачного животного, предусматривающий анализ числа и/или разнообразия бактериального таксона микробиома животного или содержания генов микробиома, причем число и/или разнообразие таксона ниже заданного уровня является показателем животного характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана, или число генов ниже заданного уровня является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов и/или продукции метана у жвачного животного, предусматривающий количественное определение по меньшей мере одного вида бактерий, как представлено в таблицах 4 и 5, в микробиоме животного, причем если уровень по меньшей мере одного вида бактерий в таблице 4 выше заданного уровня, это является показателем высокой эффективности использования кормов или низкой продукции метана

и если уровень по меньшей мере одного вида бактерий, представленного в таблице 5, ниже заданного уровня, это является показателем высокой эффективности использования кормов или низкой продукции метана.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов и/или продукции метана у жвачного животного, предусматривающий количественное определение по меньшей мере одного вида бактерий рода *Megasphaera* в микробиоме животного, причем если уровень по меньшей мере одного вида бактерий выше заданного уровня, это является показателем высокой эффективности использования кормов или низкой продукции метана.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ отнесения жвачных животных к определенной категории, предусматривающий следующее:

(а) определение эффективности использования кормов или продукции метана жвачных животных, как описано в настоящем документе; и

(b) отбор животных, которые характеризуются высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрена антибактериальная композиция, содержащая по меньшей мере одно средство, которое специфически понижающе регулирует по меньшей мере один вид бактерий, который представлен в таблице 5.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов или продукции метана жвачного животного, предусматривающий анализ количества или состава короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) метаболома животного, причем количество и/или состав SCFA является показателем эффективности использования кормов или продукции метана.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ увеличения эффективности использования кормов или уменьшения продукции метана жвачного животного, предусматривающий введение животному средства, которое увеличивает количество по меньшей мере одного вида бактерий, представленного в таблице 4, в микробиоме рубца животного, тем самым увеличивая эффективность использования кормов или уменьшая продукцию метана жвачного животного.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ увеличения эффективности использования кормов или уменьшения продукции метана жвачного животного, предусматривающий введение животному средства, которое увеличивает количество рода бактерий *Megasphaera* в микробиоме рубца животного, тем самым

увеличивая эффективность использования кормов или уменьшая продукцию метана жвачного животного.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ увеличения эффективности использования кормов или уменьшения продукции метана жвачного животного, предусматривающий введение животному композиции, содержащей по меньшей мере одно средство, которое специфически понижает количество по меньшей мере одной бактерии, представленной в таблице 5, тем самым увеличивая эффективность использования кормов или уменьшая продукцию метана жвачного животного.

Согласно аспекту настоящего изобретения предусмотрена микробиологическая композиция, содержащая 2-100 видов бактерий, причем по меньшей мере один из видов является таким, как представлено в таблице 4.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один вид бактерий представляет собой *Megasphaera elsdenii* или *Coprococcus catus*.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения микробиом представляет собой непатогенный микробиом.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения микробиом включает в себя микробиом рубца или фекальный микробиом.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения определение количества осуществляют путем анализа экспрессии по меньшей мере одного гена генома по меньшей мере одной бактерии.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один вид бактерий представляет собой *Megasphaera elsdenii*.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения если количество пропионата, бутирата, валерата и/или изовалерата в метаболоме животного превышает заданный уровень, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения число таксона анализируют вплоть до уровня типа.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения разнообразие таксона анализируют на уровне вида.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения если количество общих SCFA в метаболоме животного выше заданного уровня, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения если соотношение пропионата к ацетату в метаболоме животного выше заданного количества, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

5 Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения средство содержит по меньшей мере один вид бактерий.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения средство содержит род бактерий.

10 Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения средство не является антибиотиком.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения жвачное животное моложе 6 месяцев.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция входит в состав корма.

15 Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция входит в состав силоса.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция входит в состав клизмы.

20 Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения животное лечат с помощью композиции антибиотика перед введением.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция не содержит фекальный материал.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция составлена в виде корма, силоса или клизмы.

25 Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается средним специалистом в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, можно использовать в осуществлении на практике или испытании
30 настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. В случае конфликта описание патента, включая в себя определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и
35 не подразумевается, что они являются ограничивающими.

Краткое описание чертежей

Настоящее изобретение описано в настоящем документе только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Ниже с конкретной ссылкой на подробные графические материалы подчеркивается, что показанные данные приведены в качестве примера и только с целью иллюстративного обсуждения предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения и по причине обеспечения того, что, как полагают, является самым применимым и понятным описанием принципов и концептуальных аспектов настоящего изобретения. В связи с этим не предпринимаются попытки показать структурные детали настоящего изобретения более подробно, чем это необходимо для фундаментального понимания настоящего изобретения, описание с использованием графических материалов делает очевидным для специалистов в настоящей техники то, как несколько форм настоящего изобретения можно осуществить на практике.

На графических материалах:

Фиг. 1A-G. Параметры сообщества микробиомов эффективных и неэффективных коров. (A-B). Насыщенность микробиома. Встречаемость видов (на основании секвенирования ампликонов 16S) (A) и генов (на основе секвенирования метагеномики) (B) рассчитывали и выражали в виде простой насыщенности. Ядерная плотность эффективных и неэффективных гистограмм подчеркивает различное распределение встречаемости в каждой группе микробиомов. Показаны P -значения разницы в насыщенности между эффективными и неэффективными коровами. (C) Насыщенность микробиома на разных филогенетических уровнях. (D-E) Измерения альфа-разнообразия (индекса Шеннона) в соответствии с видами (D) и генами (E). (F-G) Доминирование микробиома в соответствии с видами (F) и генами (G). Данные выражены как среднее $\pm$ SEM. Критерий суммы рангов Уилкоксона, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$.

Фиг. 2A-B. Прогнозы эффективности использования кормов по видам и генам. Виды (а) и гены (б), которые отличались по относительной численности между эффективными и неэффективными коровами, ранжировали в соответствии с их P -значениями и группировали в бины по 100. Бины использовали в качестве прогностических признаков для параметра эффективности использования кормов RFI с использованием алгоритма k -ближайших соседей (KNN) с $k = 3$. Каждая итерация использовала отличающийся бин в качестве прогностических признаков в порядке возрастания P -значения. Вставка на обоих графиках представляет первые пять значений точности прогнозирования (Перестановки случайной перетасовки классов, P -значение = 0,009).

Фиг. 3. Метаболом и микробиологическая активность микробиомов рубца эффективных и неэффективных коров. *In vivo* и *in vitro* способы изучения переваримости проводили на соке рубца эффективных и неэффективных коров в дополнение к экстракции, идентификация и количественное определение 41 различного метаболита с помощью GC и GC-MS. Эти метаболиты нормализованы до содержания органического вещества в соке рубца, из которого они были извлечены. Метаболиты организованы в соответствии с трофическими уровнями. Коррекцию гипотезы для многомерных данных с 9999 перестановками проводили индивидуально для каждого метаболического анализа или анализа активности с использованием статистики Стьюдента (Методы). Данные выражены как среднее $\pm$ SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Фиг. 4А-В. Концентрация SCFA в соке рубца эффективных и неэффективных коров. (А) Концентрации общих SCFA в образцах эффективного и неэффективного рубца. (В) Соотношение пропионата к ацетату в образцах эффективного и неэффективного рубца. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Фиг. 5А-В. Таксономические аннотации видов и генов, которыми обогащена каждая группа микробиомов. (А) Корреляция Спирмена значимо обогащенных видов с параметром эффективности использования кормов. Аннотации представлены на самом низком полученном филогенетическом уровне, а также на уровне порядка в круглых скобках. (В) Распределение филогенетических аннотаций генов, обогащенных в каждой из групп микробиомов. Представлены филогенетические аннотации выше порога 2%.

Фиг. 6А-В. Признаки микробиома, обогащенные в каждой группе микробиомов. (А) Прочтения из каждого образца выравнивали с секвенированными геномами известных микроорганизмов рубца с использованием инструмента BWA. Представлены соотношения между выравниваниями эффективных/неэффективных образцов для каждого генома. Использование и продукция метаболитов для каждого микроорганизма на основе известных характеристик роста (Holdman & Moore, 1974, Russell & Rychlik, 2001, Duncan *et al.*, 2009) окрашены в синий и оранжевый, соответственно. (В) Прочтения из каждого образца выравнивали с ферментами KEGG различных метаболических путей с использованием инструмента BWA. Пути пропандиола, акрилата и сукцината - это различные пути продукции пропионата. Представлены соотношения между выравниваниями эффективных/неэффективных образцов для каждого пути. Данные выражены как соотношение средних. Перестановочный t-критерий, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Фиг. 7А-В. Консолидированные результаты и модель. (А) Консолидация результатов анализа метаболомики, анализов мобилизации генома и пути. Зеленым цветом: пути и метаболиты, которые значимо не различались или которые не оценивали. Красным

цветом: обогащенные в эффективных микробиомах. Серым цветом: обогащенные в неэффективных микробиомах. (В) Предлагаемая модель. Слева направо: идентичные ключевые входящие метаболиты поглощены коровой и представлены либо эффективному микробиому (верхняя панель) с пониженной насыщенностью и разнообразием, либо неэффективному микробиому (нижняя панель) с повышенной насыщенностью и разнообразием. Различия в насыщенности приводят к продукции различных метаболитов. Эффективный микробиом производит меньший диапазон выходящих метаболитов, чем неэффективный микробиом, однако с большими количествами значимых выходящих метаболитов, которые доступны для энергичных потребностей животного.

Фиг. 8. Популяционное распределение RFI испытываемой когорты (146 коров). Коровы с экстремально низким ($n = 40$) и экстремально высоким ($n = 38$) RFI окрашены в красный и серый соответственно и представляют собой 25% наиболее и 25% наименее эффективных животных из когорты из 146 коров. Эти 78 коров выбирали для отбора образцов рубца и фекалий.

Фиг. 9. Процентное отношение сопоставленных прочтений от образцов эффективных и неэффективных коров ко всем генам микробиома. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM.

Фиг. 10. Число генов в образце как функция числа прочтений. Прочтения из каждого образца выравнивали со всеми генами. Число выровненных прочтений наносили на график по отношению к числу генов, полученному для каждого образца. Между двумя переменными не найдено никакой корреляции (P -значение = 0,074).

Фиг. 11. Относительная численность типов. Состав микробиома двух групп эффективности на уровне типа. Представлены типы с относительной численностью выше 0,001%. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM.

Фиг. 12А-В. Разнообразие и доминирование Шеннона эффективных и неэффективных микробиомов. (А) Разнообразие Шеннона на различных филогенетических уровнях. (В) Доминирование на различных филогенетических уровнях. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM. Критерий суммы рангов Уилкоксона, $*P < 0,05$.

Фиг. 13А-І. Прогнозирование физиологических и метаболических признаков по видам. Виды, которые отличались относительной численностью между эффективными и неэффективными коровами, сортировали по их P -значениям и группировали в бины по 100. Бины использовали в качестве прогностических признаков для различных физиологических параметров с использованием алгоритма k -ближайших соседей (KNN) с $k = 3$. Каждая итерация использовала отличающийся бин как прогностические признаки, в порядке возрастания P -значения. (А) Точность прогнозирования коэффициента конверсии

корма (CR). (B) Точность прогнозирования содержания жира молока. (C) Точность прогнозирования потребления сухого вещества (DMI). (D) Точность прогнозирования удоя молока. (E) Точность прогнозирования содержания лактозы молока. (F) Точность прогнозирования pH. (G) Точность прогнозирования содержания белка молока. (H) Точность прогнозирования энергетической ценности молока. (I) Точность прогнозирования изменения оценки упитанности в баллах (BCS).

Фиг. 14A-I. Прогнозирование физиологических и метаболических признаков по генам. Гены, которые отличались относительной численностью между эффективными и неэффективными коровами, сортировали по их *P*-значениям и группировали в бины по 100.

Бины использовали в качестве прогностических признаков для различных физиологических параметров с использованием алгоритма *k*-ближайших соседей (KNN) с $k = 3$. Каждая итерация использовала отличающийся бин как прогностические признаки, в порядке возрастания *P*-значения. Различные графики представляют прогнозы различных физиологических параметров. (A) Точность прогнозирования CR. (B) Точность прогнозирования содержания жира молока. (C) Точность прогнозирования DMI. (D) Точность прогнозирования удоя молока. (E) Точность прогнозирования содержания лактозы молока. (F) Точность прогнозирования pH. (G) Точность прогнозирования содержания белка молока. (H) Точность прогнозирования энергетической ценности молока. (I) Точность прогнозирования изменения BCS.

Фиг. 15A-J. Оценка специфичности и чувствительности прогнозов физиологических и метаболических признаков по видам. Кривые зависимости чувствительности от частот ложноположительных заключений (ROC) и измерения площади под кривой (AUC) получали для первых пяти прогностических бинов (см. фигуру 2A, фигуру 11) на основании среднего количества 1000 итераций перекрестной проверки с помощью KNN. (A) RFI. (B) ROC-анализ CR. (C) ROC-анализ содержания жира молока. (D) ROC-анализ DMI. (E) ROC-анализ удоя молока. (F) ROC-анализ содержания лактозы молока. (G) ROC-анализ pH. (H) ROC-анализ содержания белка молока. (I) ROC-анализ энергетической ценности молока. (J) ROC-анализ изменения BCS.

Фиг. 16A-J. Оценка специфичности и чувствительности прогнозов физиологических и метаболических признаков по генам. Кривые зависимости чувствительности от частот ложноположительных заключений (ROC) и измерения площади под кривой (AUC) получали для первых пяти прогностических бинов (см. фигуру 2B, фигуру 12) на основании среднего количества 1000 итераций перекрестной проверки с помощью KNN. (A) RFI. (B) ROC-анализ CR. (C) ROC-анализ содержания жира молока. (D) ROC-анализ DMI. (E) ROC-анализ удоя молока. (F) ROC-анализ содержания лактозы молока. (G) ROC-анализ pH. (H)

ROC-анализ содержания белка молока. (I) ROC-анализ энергетической ценности молока. (J) ROC-анализ изменения BCS.

Фиг. 17A-D. In vitro переваримость и in vivo переваримость. (A) In vitro переваримость сухого вещества (DM) корма после 24 ч инкубации с соком рубца эффективных и неэффективных коров. (B) In vitro переваримость нейтрально расщепляемой клетчатки (NDF) корма после 24 ч инкубации с соком рубца эффективных и неэффективных коров. (C) In vivo DM переваримость эффективных и неэффективных образцов кала. (D) In vivo NDF переваримость эффективных и неэффективных образцов кала. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM.

Фиг. 18. Относительная численность значимо различных видов. Относительная численность 18 видов, которые оказались значимо различными между двумя группами эффективности. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM.

Фиг. 19. Анализ основных компонентов (PCA) генов, обогащенных в двух группах эффективности - PCA проводили для микробиомов эффективных и неэффективных коров с использованием 34166 генов, которые являлись значимо различными между двумя группами эффективности.

Фиг. 20. Выравнивание прочтений с известными геномами микроорганизмов рубца. Прочтения из каждого образца выравнивали с секвенированными геномами известных микроорганизмов рубца с использованием инструмента BWA. Представлены соотношения между набором эффективных/неэффективных образцов для каждого генома. Данные выражены как среднее $\pm$ SEM. Перестановочный t-критерий, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

Фиг. 21. Распространение акрилатного пути среди организмов микробиома рубца. Прочтения от всех образцов подвергали BLAST по генам субъединиц альфа бета и гамма лактоил-СоА-дегидратазы, (Reichardt *et al.*, 2014). Прочтения, которые прошли граничное значение, составляющее 60% идентичности, собирали и аннотировали с использованием базы данных NR. Представлено процентное отношение каждой аннотации к общему числу прочтений.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение, согласно некоторым его вариантам осуществления, относится к микрофлоре рубца и ее применениям. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к микрофлоре рубца для регулирования эффективности использования кормов и продукции метана у жвачных животных.

Следует понимать, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также можно представить в комбинации в одном варианте осуществления. Напротив, различные признаки настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также можно представить отдельно или в любой подходящей подкомбинации.

Жвачные животные полностью зависят от их микробиоты для переваривания корма и, следовательно, ее жизнеспособности. Авторы настоящего изобретения предположили, что может существовать связь между составом и относительной численностью резидентных бактериальных таксонов рубца и физиологических параметров хозяина.

Эффективность использования кормов измеряли у 146 дойных коров и анализы таксономического состава, содержания генов, микробиологической активности и метаболомной композиции проводили на микробиомах рубца из 78 животных с самыми экстремальными фенотипами. Пониженная насыщенность в отношении содержания генов микробиома и таксонов тесно связана с более высокой эффективностью использования кормов. Гены и виды микробиома точно спрогнозировали фенотип эффективности использования кормов животных. Специфическое обогащение микроорганизмов и метаболитических путей в каждой из этих групп микробиома приводило к лучшему направлению потоков энергии и углерода к животному, при этом снижая выбросы метана в атмосферу. Это понимание вклада в экологию и механизмов в микробиоме рубца может привести к увеличению доступных продовольственных ресурсов и экологически безопасного животноводства.

Таким образом, согласно первому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов или продукции метана жвачного животного, предусматривающий анализ числа и/или разнообразия бактериального таксона микробиома животного, причем число и/или разнообразие таксона ниже заданного уровня является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Используемый в настоящем документе термин “эффективность использования кормов” относится к способности животного извлекать энергию из своей пищи. Эффективность использования кормов представляет собой разницу между фактическим потреблением корма животного и его прогнозируемым потреблением корма на основе его уровня продукции и массы тела. Таким образом, животное с “высокой” эффективностью использования кормов представляет собой животное, которое производит больше молока или весит больше того, чем спрогнозировано на основе его потребления корма. Животное

с “отрицательной” эффективностью использования кормов представляет собой животное, которое производит меньше молока или весит меньше, чем спрогнозировано на основе его потребления корма. Согласно одному варианту осуществления энергетическую эффективность измеряют с использованием способа остаточного потребления корма (RFI) (Koch *et al.*, 1963) и ее можно рассчитать в соответствии с формулами Национального исследовательского совета 2001 года. Ожидаемые значения RFI для каждой коровы можно рассчитать на основе уравнения множественной регрессии.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 0,05 стандартных отклонений ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 0,05 стандартных отклонений ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 1 стандартное отклонение ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 2 стандартных отклонения ниже среднего значения RFI стада, при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 3 стандартных отклонения ниже среднего значения RFI стада, при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 4 стандартных отклонения ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 5 стандартных отклонений ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 6 стандартных отклонений ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

5 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой эффективностью использования кормов), если оно характеризуется по меньшей мере на 0,05 стандартных отклонений выше среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

10 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно характеризуется по меньшей мере на 0,5 стандартных отклонений выше среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

15 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно характеризуется по меньшей мере на 1 стандартное отклонение выше среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

20 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно характеризуется по меньшей мере на 2 стандартных отклонения выше среднего значения RFI стада, при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно характеризуется по меньшей мере на 3 стандартных отклонения выше среднего значения RFI стада, при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

25 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно характеризуется по меньшей мере на 4 стандартных отклонения выше среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

30 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно характеризуется по меньшей мере на 5 стандартных отклонений ниже среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся высоким RFI (или низкой энергетической эффективностью), если оно

характеризуется по меньшей мере на 6 стандартных отклонений выше среднего значения RFI стада (при этом стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
5 если его потребление сухого вещества (DMI) составляет менее 1 кг в день, чем прогнозировали в соответствии с его ожидаемым потреблением пищи (рассчитанным как функция массы и продукции молока, как описано в настоящем документе выше).

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
10 если его потребление сухого вещества (DMI) составляет менее 2 кг в день, чем прогнозировали в соответствии с его ожидаемым потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
15 если его потребление сухого вещества (DMI) составляет менее 4 кг в день, чем прогнозировали в соответствии с его ожидаемым потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
если его потребление сухого вещества (DMI) составляет менее 8 кг в день, чем прогнозировали в соответствии с его ожидаемым потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
20 если его потребление сухого вещества (DMI) составляет менее 16 кг в день, чем прогнозировали в соответствии с его ожидаемым потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
25 если его потребление сухого вещества (DMI) составляет менее 32 кг в день, чем прогнозировали в соответствии с его ожидаемым потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
30 если оно производит 1,5-кратное количество молока или весит в 1,5 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов),
если оно производит 2-кратное количество молока или весит в 2 раза больше массы, чем
35 прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно производит 2,5 -кратное количество молока или весит 2,5 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

5 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно производит 3-кратное количество молока или весит 3 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

10 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно производит 3,5-кратное количество молока или весит 3,5 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

15 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно производит 4-кратное количество молока или весит 4 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

20 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно производит 4,5-кратное количество молока или весит 4,5 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как характеризующееся низким RFI (или высокой эффективностью использования кормов), если оно производит 5-кратное количество молока или весит 5 раза больше массы, чем прогнозировали в соответствии с его потреблением пищи.

25 Термин “продукция метана” относится к количеству метана, выделяемого животными в чистом виде или производимого микробиомом. Ее можно измерять в единицах г в день или г на кг потребления сухого вещества.

30 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 0,05 стандартных отклонений выше средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 0,5 стандартных отклонений выше средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 1 стандартное отклонение выше средней продукции метана стада.

5 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 2 стандартных отклонения выше средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 3 стандартных отклонения выше средней продукции метана стада.

10 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 4 стандартных отклонения выше средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 5 стандартных отклонений выше средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “высокий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 6 стандартных отклонений выше средней продукции метана стада.

20 Термин “низкий производитель метана” относится к количеству, составляющему меньше чем 100 г в день или 10 г на кг потребления сухого вещества, которое производится в микробиоме (например, микробиоме рубца/фекальном микробиоме) животного.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “низкий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 0,05 стандартных отклонений ниже средней продукции метана стада.

25 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “низкий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 0,5 стандартных отклонений ниже средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “низкий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 1 стандартное отклонение ниже средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как “низкий производитель метана”, если оно характеризуется по меньшей мере на 2 стандартных отклонения ниже средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как "низкий производитель метана", если оно характеризуется по меньшей мере на 3 стандартных отклонения ниже средней продукции метана стада.

5 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как "низкий производитель метана", если оно характеризуется по меньшей мере на 4 стандартных отклонения ниже средней продукции метана стада.

Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как "низкий производитель метана", если оно характеризуется по меньшей мере на 5 стандартных отклонений ниже средней продукции метана стада.

10 Согласно одному варианту осуществления животное можно классифицировать как "низкий производитель метана", если оно характеризуется по меньшей мере на 6 стандартных отклонений ниже средней продукции метана стада.

Жвачные животные, предусмотренные настоящим изобретением, включают в себя, например, следующих: крупный рогатый скот (например, коровы), козы, овцы, жирафы, 15 американский бизон, европейский зубр, яки, азиатский буйвол, олени, верблюды, альпаки, ламы, гну, антилопа, вилорогая антилопа и антилопа нильгау.

Согласно конкретному варианту осуществления жвачное животное представляет собой корову.

Согласно настоящему изобретению предусмотрено определение эффективности 20 использования кормов у жвачных животных всех возрастов. Согласно конкретному варианту осуществления животные, фенотип которых изменен, являются новорожденными, как правило, возрастом не более одного дня. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более двух дней. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более трех дней. Согласно 25 другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 1 недели. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 2 недель. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 1 месяца. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 3 месяцев. Согласно еще одному варианту осуществления животные являются взрослыми.

30 Используемый в настоящем документе термин "микробиом" относится к совокупности микроорганизмов (бактерий, грибов, простейших), их генетических элементов (геномов) в определенной среде.

Согласно конкретному варианту осуществления микробиом представляет собой микробиом рубца.

Согласно другому варианту осуществления микробиом получен из здорового животного (т.е. микробиом представляет собой непатогенный микробиом).

Образец микробиоты содержит образец микроорганизмов и/или их компонентов или продуктов из микробиома.

- 5 Согласно некоторым вариантам осуществления образец микробиоты собирают с помощью любого средства, которое обеспечивает возможность извлечения микроорганизмов или их компонентов или продуктов микробиома и является подходящим для соответствующего источника микробиома, например, рубца.

- 10 Рубец можно собирать с использованием способов, известных в настоящей области техники и которые включают в себя, например, применение желудочного зонда с вакуумным пробоотборником рубца. Как правило, забор рубца осуществляют после кормления.

- Согласно некоторым вариантам осуществления вместо анализа образца рубца используют фекальный образец, который отражает микробиом рубца. Таким образом, 15 согласно этому варианту осуществления анализируют фекальный микробиом.

Согласно одному варианту осуществления этого аспекта настоящего изобретения анализируют число бактериальных таксонов в образце микробиоты и/или анализируют число генов в образце микробиоты. Этот анализ соответствует насыщенности образца микробиоты.

- 20 Необязательно относительную численность каждого из таксонов/генов также анализируют с тем, чтобы получить меру разнообразия или доминирования образца.

- Разнообразие таксонов** состоит из двух компонентов: насыщенность таксона (например, вида) и таксономическая (например, видовая) равномерность распределения. Видовая насыщенность представляет собой простой подсчет видов, тогда как 25 равномерность распределения видов количественно определяет то, насколько равными являются относительные численности видов.

- Доминирование:** Измеряет вероятность того, что два индивидуума, случайно выбранные из образца, будут принадлежать одному и тому же таксону, оно находится в диапазоне от 0 (все таксоны присутствуют в равной степени) до 1 (один таксон полностью 30 доминирует над сообществом).

Доминирование: сумма $((n_i/n)^2)$, где n_i представляет собой число индивидуумов таксона i .

Микрофлору рубца можно анализировать на количественном уровне и/или качественном уровне.

Способы количественного определения уровней генов и микроорганизмов (например, бактерий) различных таксонов описаны в настоящем документе ниже.

Согласно некоторым вариантам осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микроорганизмов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одной или нескольких последовательностей ДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько последовательностей ДНК содержат любую последовательность ДНК, которую можно использовать для установления различия между различными микробиологическими типами. Согласно определенным вариантам осуществления одна или несколько последовательностей ДНК содержат генные последовательности 16S рРНК. Согласно определенным вариантам осуществления одна или несколько последовательностей ДНК содержат генные последовательности 18S рРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления амплифицируют 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 1000, 5000 или больше последовательностей.

Отнесение вида к определенному таксону можно проводить с использованием подходящей компьютерной программы (например, BLAST) по соответствующей справочной базе данных (например, справочной базы данных 16S рРНК).

При определении того, является ли нуклеиновая кислота или белок по существу гомологичным или характеризуется определенным общим процентным соотношением идентичности последовательности по отношению к последовательности согласно настоящему изобретению, сходство последовательностей можно определить с помощью общепринятых алгоритмов, которые обычно позволяют вводить небольшое количество разрывов для достижения наилучшего соответствия. В частности, "идентичность в процентах" двух полипептидов или двух последовательностей нуклеиновых кислот определяют с использованием алгоритма Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1993). Такой алгоритм включен в программы BLASTN и BLASTX Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Поиски нуклеотидов BLAST можно проводить с помощью программы BLASTN для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекуле нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. В равной степени, поиски белков BLAST можно проводить с помощью программы BLASTX для получения аминокислотных последовательностей, которые являются гомологичными полипептиду согласно настоящему изобретению. Для получения содержащих разрывы выравниваний для целей сравнения используют Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). При использовании программ BLAST и Gapped

BLAST используют параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTX и BLASTN).

Согласно одному варианту осуществления для классификации микроорганизма как принадлежащего к конкретному роду, он должен характеризоваться по меньшей мере 90% гомологии последовательностей, по меньшей мере 91% гомологии последовательностей, по меньшей мере 92% гомологии последовательностей, по меньшей мере 93% гомологии последовательностей, по меньшей мере 94% гомологии последовательностей, по меньшей мере 95% гомологии последовательностей, по меньшей мере 96% гомологии последовательностей, по меньшей мере 97% гомологии последовательностей, по меньшей мере 98% гомологии последовательностей, по меньшей мере 99% гомологии последовательностей по отношению к эталонному микроорганизму, который, как известно, принадлежит к конкретному роду. Согласно конкретному варианту осуществления гомология последовательностей составляет по меньшей мере 95%.

Согласно другому варианту осуществления для классификации микроорганизма как принадлежащего к конкретному виду, он должен характеризоваться по меньшей мере 90% гомологии последовательностей, по меньшей мере 91% гомологии последовательностей, по меньшей мере 92% гомологии последовательностей, по меньшей мере 93% гомологии последовательностей, по меньшей мере 94% гомологии последовательностей, по меньшей мере 95% гомологии последовательностей, по меньшей мере 96% гомологии последовательностей, по меньшей мере 97% гомологии последовательностей, по меньшей мере 98% гомологии последовательностей, по меньшей мере 99% гомологии последовательностей по отношению к эталонному микроорганизму, который, как известно, принадлежит к конкретному виду. Согласно конкретному варианту осуществления гомология последовательностей составляет по меньшей мере 97%.

Согласно некоторым вариантам осуществления образец микробиоты анализируют напрямую в отношении уровня или набора уровней одной или нескольких последовательностей ДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления ДНК выделяют из образца микробиоты и выделенную ДНК анализируют в отношении уровня или набора уровней одной или нескольких последовательностей ДНК. Способы выделения микробиологической ДНК хорошо известны в настоящей области техники. Примеры включают в себя без ограничения фенольно-хлороформную экстракцию и широкий спектр коммерчески доступных наборов, включая в себя набор QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, Calif.).

Согласно некоторым вариантам осуществления уровень или набор уровней одной или нескольких последовательностей ДНК определяют путем амплификации

последовательностей ДНК с использованием ПЦР (например, стандартная ПЦР, полукOLIчественная или количественная ПЦР). Согласно некоторым вариантам осуществления уровень или набор уровней одной или нескольких последовательностей ДНК определяют путем амплификации последовательностей ДНК с использованием количественной ПЦР. Эти и другие основные процедуры амплификации ДНК хорошо известны практикующим специалистам в настоящей области техники и описаны в Ausubel et al. (Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: New York).

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности ДНК амплифицируют с использованием праймеров, специфических в отношении одной или нескольких последовательностей, которые отличают отдельные микробиологические типы от других, отличающихся микробиологических типов. Согласно некоторым вариантам осуществления генные последовательности 16S рРНК или их фрагменты амплифицируют с использованием праймеров, специфических в отношении генных последовательностей 16S рРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности 18S ДНК амплифицируют с использованием праймеров, специфических в отношении последовательностей 18S ДНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления уровень или набор уровней одной или нескольких генных последовательностей 16S рРНК определяют с использованием технологии филочипа. Применение филочипов хорошо известно в настоящей области техники и описано в Hazen et al. ("Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria." Science, 330, 204-208, 2010), полное содержание которой включено посредством ссылки. Вкратце, последовательности генов 16S рРНК амплифицируют и метят из ДНК, экстрагированной из образца микробиоты. Амплифицированную ДНК затем гибридизируют с матрицей, содержащей зонды для микробиологических генов 16S рРНК. Уровень связывания с каждым зондом затем количественно оценивают, получая уровень микробиологического типа в образце, соответствующий подвергнутой зондированию последовательности гена 16S рРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления анализ филочипа выполняет коммерческий поставщик. Примеры включают в себя без ограничения Second Genome Inc. (San Francisco, Calif.).

Согласно некоторым вариантам осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микроорганизмов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одного или нескольких продуктов микробиологической РНК (например, транскриптов). Способы количественного определения уровней транскриптов РНК хорошо известны в настоящей

области техники и включают в себя без ограничения нозерн-анализ, полуколичественную ПЦР с обратной транскриптазой, количественную ПЦР с обратной транскриптазой и микроматричный анализ. Эти и другие основные процедуры обнаружения транскрипта РНК описаны в Ausubel et al. (Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: New York).

Согласно некоторым вариантам осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микроорганизмов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одного или нескольких белков микроорганизмов. Способы количественного определения содержаний белка хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя без ограничения вестерн-анализ и масс-спектрометрию. Эти и все другие основные процедуры обнаружения белка описаны в Ausubel et al. (Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: New York). Согласно некоторым вариантам осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микроорганизмов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одного или нескольких метаболитов микроорганизмов. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни метаболитов определяют с помощью масс-спектрометрии. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни метаболитов определяют с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни метаболитов определяют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Согласно некоторым вариантам осуществления уровни метаболитов определяют с помощью колориметрии. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни метаболитов определяют с помощью спектрофотометрии.

Согласно некоторым вариантам осуществления тем, что определяют, является распределение семейств микроорганизмов в микробиоме. Тем не менее, определение характеристик можно перенести на более детальные уровни, например, на уровень рода и/или вида, и/или на уровень штамма или вариации (например, вариантов) внутри вида, если это необходимо (включая в себя наличие или отсутствие различных генетических элементов, таких как гены, наличие или отсутствие плазмид и т.д.). Альтернативно можно использовать более высокие таксономические обозначения, такие как тип, класс или порядок. Цель состоит в том, чтобы идентифицировать, какие микроорганизмы (как правило, бактерии, но также необязательно грибы (например, дрожжи), простейшие и т.д.) присутствуют в образце от жвачного животного, а также относительные распределения этих микроорганизмов, например, выраженные как процентное отношение от общего числа

присутствующих микроорганизмов, тем самым устанавливая профиль микрофлоры или сигнатуру для исследуемого животного.

Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, когда рассматривают большое количество таксонов, оценивают общий профиль микрофлоры, т.е. идентифицируют не только конкретные таксоны, но и процентное отношение каждого составляющего таксона принимают во внимание по сравнению со всеми обнаруженными таксонами и, как правило, или, необязательно, друг с другом. Специалистам в настоящей области техники понятно, что существует множество возможных способов выражения или компиляции таких данных, все из которых включены в настоящее изобретение. Например, формат "круговой диаграммы" можно использовать для отображения сигнатуры микрофлоры; или же отношения можно выразить численно или графически как отношения или процентные отношения всех обнаруженных таксонов и т.д. Кроме того, данные можно обрабатывать так, чтобы учитывались только выбранные поднаборы таксонов (например, ключевые показатели с сильными положительными корреляциями). Данные можно выразить, например, в процентах от общего числа обнаруженных микроорганизмов или в процентах по массе и т.д.

Согласно одному варианту осуществления непараметрический многомерный критерий, такой как Metastats, анализ общности, анализ главных компонент, непараметрический многофакторный дисперсионный анализ (критерий Краскела-Уоллиса) и т.д., можно использовать для связывания сигнатуры микробиома с конкретным фенотипом со статистически значимым (P-значением), составляющим меньше чем 0,05. Такие критерии известны в настоящей области техники и описаны, например, White JR, Nagarajan N, Pop M (2009) Statistical Methods for Detecting Differentially Abundant Features in Clinical Metagenomic Samples. PLoS Computational Biology 5(4): 1- 11; и Clarke KR, Gorley RN (2001) PRIMER v5: User Manual and Tutorial, PRIMER-E Ltd. Plymouth Marine Laboratory, UK.

Согласно другим вариантам осуществления филогенетические способы, такие как Unifrac, можно использовать для связывания сигнатуры микробиома с конкретным фенотипом со статистически значимым (P-значением), составляющим меньше чем 0,05. См., например, Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 71:8228-8235.

Согласно другим вариантам осуществления метод опорных векторов можно использовать для связывания сигнатуры микробиома с конкретным фенотипом с достаточно высокой мерой точности классификации (F-мерой) и подходящей чувствительностью и специфичностью, которая принята в настоящей области техники. См.,

например, Yang C, Mills D, Mathee K, Wang Y, Jayachandran K, Sikaroodi M, Gillevet P, Entry J, Narasimhan G (2006). An ecoinformatics tool for microbial community studies: Supervised classification of Amplicon Length Heterogeneity (ALH) profiles of 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods* 65(1):49-62.

5 Согласно другим вариантам осуществления способы корреляционной сети и сети корреляционной разницы можно использовать для связывания сигнатуры микробиома с конкретным фенотипом со статистически значимым (Р-значением), составляющим меньше чем 0,05. См., например, Weckwerth W, Loureiro ME, Wenzel, Fiehn O (2004) Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. *PNAS* 101(20):7809-7814.

10 Как указано, если число бактериального таксона микробиома жвачного животного находится ниже заданного уровня, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Используемый в настоящем документе термин “показатель” относится к вероятности того, что ассоциация с конкретным фенотипом превышает 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или выше.

Число бактериального таксона можно анализировать на уровне вида, рода, семейства, порядка, класса или типа.

20 Кроме того, если число генов микробиома жвачного животного ниже заданного уровня, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Согласно одному варианту осуществления если число видов бактерий, присутствующих в образце микробиома, составляет ниже 6000, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

25 Согласно другому варианту осуществления если число видов бактерий, присутствующих в образце микробиома, составляет ниже 5000, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

Согласно другому варианту осуществления если число видов бактерий составляет ниже 4000, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

30 Согласно одному варианту осуществления если число бактериальных генов, присутствующих в образце микробиома, составляет ниже 4×10^6 , это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

Согласно другому варианту осуществления если число бактериальных генов присутствующих в образце микробиома, составляет ниже $3,5 \times 10^6$, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

5 Согласно другому варианту осуществления если число родов бактерий, присутствующих в образце микробиома, составляет ниже 120, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

Согласно другому варианту осуществления если число родов бактерий составляет ниже 100, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

10 Согласно другому варианту осуществления если число семейств бактерий, присутствующих в образце микробиома, составляет ниже 70, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

Согласно другому варианту осуществления если число семейств бактерий составляет ниже 60, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

Согласно другому варианту осуществления если число порядков бактерий составляет ниже 35, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

20 Согласно другому варианту осуществления если число классов бактерий составляет ниже 25, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

Согласно другому варианту осуществления если число типов бактерий составляет ниже 14, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов.

25 Кроме того, если разнообразие таксона (например, вида) и/или генов находится ниже заданного уровня, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Более того, если доминирование таксона (например, вида) и/или генов находится выше заданного уровня, это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

30 С использованием тщательно разработанных техник секвенирования и скрининга авторы настоящего изобретения обнаружили популяции бактерий, которые можно использовать для прогнозирования параметров, включая в себя эффективность использования кормов (например, измеряемую с помощью RFI), которая обратно пропорциональна продукции метана микробиома рубца.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов и/или продукции метана у жвачного животного, предусматривающий количественное определение по меньшей мере одного вида бактерий, как представлено в таблицах 4 и 5, в микробиоме животного, причем
5 если уровень по меньшей мере одного вида бактерий в таблице 4 выше заданного уровня, это является показателем высокой эффективности использования кормов или низкой продукции метана, и если уровень по меньшей мере одного вида бактерий, представленного в таблице 5, ниже заданного уровня, это является показателем высокой эффективности использования кормов или низкой продукции метана.

10 Таблицы 4 и 5 представлены в конце раздела «Примеры» в настоящем документе ниже.

Следует понимать, что в некоторых случаях в таблицах 4 и 5 представлены конкретные штаммы бактерий. Тем не менее, согласно настоящему изобретению предусмотрен анализ всех штаммов вида, к которому они принадлежат. Упоминание
15 конкретного штамма никоим образом не должно являться ограничивающим.

Таким образом, например, в случае *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061, несмотря на то, что в таблице 4 указан только номер штамма, авторы настоящего изобретения предусматривают анализ любого штамма вида *Methanobrevibacter smithii*.

Когда таксоны выше видов перечислены в таблицах 4 и 5, указан идентификатор
20 16S, это означает, что точный вид следует рассматривать как полностью раскрытый.

Заданный уровень можно установить с использованием контрольных образцов, полученных от животных, которые были предварительно классифицированы как высокий производитель метана/низкий производитель метана или как характеризующиеся высоким RFI/низким RFI. Таким образом, например, если количество видов бактерий из таблицы 4
25 является выше по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или выше, чем количество, которое присутствует в микробиоме животного, предварительно классифицированного как животное со средним значением RFI, то животное можно классифицировать как животное с низким RFI (высокой энергетической эффективностью). Если количество видов бактерий из таблицы 5 является ниже по меньшей мере в 1,5 раза, в
30 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или ниже, чем количество, которое присутствует в микробиоме животного, предварительно классифицированного как животное со средним значением RFI, то животное можно классифицировать как животное с высоким RFI (низкой энергетической эффективностью).

Следует понимать, что классификация не обязательно должна ограничиваться
35 двоичной классификацией (высокий/низкий), поскольку авторы настоящего изобретения

показали, что количество бактерий коррелирует с RFI. Таким образом, животное также можно оценить по шкале с использованием многих недвоичных систем.

Способы количественного определения уровня видов бактерий известны специалистам в настоящей области техники, включая в себя способы секвенирования и количественное определение видоспецифических генов, как описано в настоящем документе выше.

При сравнении генов и таксономических профилей между микробиомами эффективных и неэффективных животных авторы настоящего изобретения обнаружили, что гены, принадлежащие акрилатному пути, в большом количестве наблюдали у эффективных животных по сравнению с неэффективными животными.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения вид бактерий, который анализируют, представляют собой вид, который использует акрилатный путь.

Используемая в настоящем документе фраза “бактерия, которая использует акрилатный путь” относится к бактерии, которая способна производить пропионовую кислоту из молочной кислоты. Таким образом, бактерия экспрессирует гены, кодирующие ферменты, характеризующиеся следующими номерами согласно ЕС: ЕС 1.3.8.7, 2.8.3.1 и 4.2.1.54.

Иллюстративные виды, которые используют акрилатный путь, включают в себя без ограничения *Megasphaera elsdenii*, *Coprococcus catus*, *Clostridium propionicum* и *Clostridium botulinum*.

Авторы настоящего изобретения предусматривают классификацию животных на основании уровня по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100 или всех видов, раскрытых в таблицах 4 и 5.

Согласно конкретному варианту осуществления множество видов бактерий анализируют с тем, чтобы получить бактериальную сигнатуру. Сигнатуру часто сравнивают с сигнатурой, полученной от животного, которое уже классифицировали в соответствии с его эффективностью использования кормов/продукцией метана. Например, если исследуемая сигнатура является статистически значимо сходной с контрольной сигнатурой, которая, как известно, представляет собой высокий производитель метана, то это животное можно классифицировать как высокий производитель метана. Если исследуемая сигнатура является статистически значимо сходной с контрольной сигнатурой, которая, как известно, представляет собой низкий производитель метана, то

это животное можно классифицировать как низкий производитель метана. Если исследуемая сигнатура статистически значимо отличается от контрольной сигнатуры, которая, как известно, представляет собой низкий производитель метана, то это животное можно классифицировать как высокий производитель метана. Если исследуемая сигнатура статистически значимо отличается от контрольной сигнатуры, которая, как известно, представляет собой высокий производитель метана, то это животное можно классифицировать как низкий производитель метана.

Согласно одному варианту осуществления этого аспекта настоящего изобретения две сигнатуры микроорганизмов могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если они содержат по меньшей мере 50% одинаковых видов, по меньшей мере 60% одинаковых видов, по меньшей мере 70% одинаковых видов, по меньшей мере 80% одинаковых видов, по меньшей мере 90% одинаковых видов, по меньшей мере 91% одинаковых видов, по меньшей мере 92% одинаковых видов, по меньшей мере 93% одинаковых видов, по меньшей мере 94% одинаковых видов, по меньшей мере 95% одинаковых видов, по меньшей мере 96% одинаковых видов, по меньшей мере 97% одинаковых видов, по меньшей мере 98% одинаковых видов, по меньшей мере 99% одинаковых видов или 100% одинаковых видов.

Дополнительно или альтернативно, микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если количество (например, встречаемость) в микробиоме по меньшей мере одного из видов бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 10% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 20% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 30% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 40% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 50% бактерий, представленных в таблицах 4

и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 60% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 70% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 80% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Согласно другому варианту осуществления микробиомы могут характеризоваться статистически значимо сходной сигнатурой, если относительное соотношение в микробиоме по меньшей мере 90% бактерий, представленных в таблицах 4 и 5, является идентичным. Таким образом, фракционное процентное отношение микроорганизмов (например, относительное количество, соотношение, распределение, частота, процентное отношение и т.д.) от общего числа может являться статистически сходным.

Авторы настоящего изобретения также отметили, что анализ всего рода *Megasphaera* можно использовать для прогнозирования выделения метана и/или RFI.

Таким образом, согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ определения эффективности использования кормов и/или продукции метана у жвачного животного, предусматривающий количественное определение по меньшей мере одного вида бактерий рода *Megasphaera* в микробиоме животного, причем если уровень по меньшей мере одного вида бактерий выше заданного уровня, это является показателем высокой эффективности использования кормов или низкой продукции метана.

Способ согласно этому аспекту настоящего изобретения можно провести с использованием способов, известных в настоящей области техники для количественного определения бактерий (как подробно описано в настоящем документе выше) или путем анализа последовательностей ДНК, как обсуждалось в настоящем документе выше.

Заданный уровень согласно настоящему аспекту настоящего изобретения можно определить, как описано в настоящем документе выше.

Наборы для проведения ПЦР для обнаружения *Megasphaera elsdenii* раскрыты в Advanced kit handbook HB10.03.07 - Quantification of *Megasphaera cerevisiae*/*Megasphaera elsdenii* genomes. 7.

Как уже упоминалось, а также для измерения бактерий и генов, присутствующих в микробиоме, авторы настоящего изобретения также показали, что измерение метаболитов,

присутствующих в микробиоме (т.е. метаболоме), также может служить указанием на статус эффективности использования кормов и продукции метана микробиома жвачного животного.

Более конкретно, авторы настоящего изобретения показали, что уровни короткоцепочечных жирных кислот в метаболоме жвачного животного можно использовать для оценки эффективности использования кормов и продукции метана животного.

Согласно одному варианту осуществления измеряют метаболом рубца. Согласно другому варианту осуществления измеряют метаболом кала животного.

Используемый в настоящем документе "метаболит" представляет собой промежуточное соединение или продукт метаболизма. Термин "метаболит", как правило, ограничен малыми молекулами и не включает в себя полимерные соединения, такие как ДНК или белки, длина которых превышает 100 аминокислот. Метаболит может служить в качестве субстрата для фермента метаболического пути, промежуточного соединения такого пути или продукта, полученного метаболическим путем.

Согласно одному варианту осуществления анализируют не больше чем 5 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 10 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 15 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 20 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 30 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 40 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 50 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 60 метаболитов. Согласно другому варианту осуществления измеряют не больше чем 100 метаболитов.

Согласно конкретному варианту осуществления метаболит представляет собой то, что изменяет состав или функцию микробиома.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления метаболиты включают в себя без ограничения сахара, органические кислоты, аминокислоты, жирные кислоты, гормоны, витамины, а также их ионные фрагменты. Согласно другому варианту осуществления метаболит представляет собой олигопептиды (меньше чем приблизительно 100 аминокислот в длину).

В частности, молекулярная масса метаболитов составляет меньше чем приблизительно 3000 Да и более конкретно от приблизительно 50 до приблизительно 3000 Да.

Предпочтительно метаболит присутствует в микроорганизмах микробиома или секретируется из микроорганизмов микробиома.

Метаболит согласно этому аспекту настоящего изобретения может представлять собой первичный метаболит (т.е. необходимый для роста микроорганизма) или вторичный метаболит (тот, который не играет роль в росте, развитии или размножении и образуется в конце или вблизи стационарной фазы роста).

Репрезентативные примеры метаболических путей, в которые вовлечены метаболиты согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения следующее: цикл Кребса, дыхательная цепь, фотосинтез, фотодыхание, гликолиз, глюконеогенез, гексозомонофосфатный путь, окислительный пентозофосфатный путь, акрилатный путь, сукцинатный путь, путь метаногенеза, пропандиоловый путь, продукция и β -окисление жирных кислот, цикл обмена мочевины, пути биосинтеза аминокислот, пути разрушения белков, такие как протеасомное разрушение, пути разложения аминокислот, биосинтез или разложение следующего: липиды, поликетиды (включая в себя, например, флавоноиды и изофлавоноиды), изопреноиды (включая в себя, например, терпены, стерины, стероиды, каротеноиды, ксантофиллы), углеводы, фенилпропаноиды и производные, алкалоиды, бензоиды, индолы, соединения индолов и серы, порфирины, антоцианы, гормоны, витамины, кофакторы, такие как простетические группы или переносчики электронов, лигнин, глюкозинолаты, пурины, пиримидины, нуклеозиды, нуклеотиды и родственные молекулы, такие как тРНК, микроРНК (miРНК) или иРНК.

Согласно конкретному варианту осуществления метаболит представляет собой короткоцепочечную жирную кислоту (например, выбранную из группы, состоящей из пропионата, бутирата, валерата и изовалерата).

Согласно этому варианту осуществления если по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или все из пропионата, бутирата, валерата и изовалерата превышают заданный уровень, это является показателем того, что животное характеризуется высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Авторы настоящего изобретения дополнительно обнаружили, что измерение общего количества короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) в метаболоме животного можно использовать для оценки эффективности использования кормов. Таким образом, если количество всех SCFA превышает заданный уровень (например, 0,05 м.д.), это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

Более того, если соотношение пропионата к ацетату в метаболоме животного выше заданного количества (например, 1,1 или 1,2), это является показателем животного, характеризующегося высокой эффективностью использования кормов и низкой продукцией метана.

5 Согласно одному варианту осуществления метаболиты идентифицируют с использованием способа физического разделения.

Используемый в настоящем документе термин "способ физического разделения" относится к любому способу, известному специалистам в настоящей области техники, достаточному для получения профиля изменений и различий в малых молекулах, производимых в hSLC, в контакте с токсическим, тератогенным или исследуемым химическим соединением согласно способам настоящего изобретения. Согласно предпочтительному варианту осуществления способы физического разделения позволяют обнаруживать клеточные метаболиты, включая в себя без ограничения сахара, органические кислоты, аминокислоты, жирные кислоты, гормоны, витамины и олигопептиды, а также их ионные фрагменты и низкомолекулярные соединения (предпочтительно с молекулярной массой менее 3000 Да, и более конкретно от 50 до 3000 Да). Например, можно использовать масс-спектрометрию. Согласно конкретным вариантам осуществления этот анализ проводят путем жидкостной хроматографии/времяпролетной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (LC/ESI-TOF-MS), однако следует понимать, что метаболиты, представленные в настоящем документе, можно обнаружить с использованием альтернативных спектрометрических способов или других способов, известных в настоящей области техники для анализа этих типов соединений в этом диапазоне размеров.

25 Определенные метаболиты можно идентифицировать, например, с помощью анализа экспрессии генов, включая в себя ПЦР в режиме реального времени, ОТ-ПЦР, нозерн-анализ и *in situ* гибридизацию.

Кроме того, метаболиты можно идентифицировать с использованием масс-спектрометрии, такой как MALDI/TOF (времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация), SELDI/TOF (времяпролетная усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация), жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (LC-MS), газовая хроматография/масс-спектрометрия (GC-MS), высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (HPLC-MS), капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия, спектрометрия ядерного магнитного резонанса, tandemная масс-спектрометрия (например, MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS и т.д.), вторично-ионная масс-

спектрометрия (SIMS) или спектрометрия подвижности ионов (например, GC-IMS, IMS-MS, LC-IMS, LC-IMS-MS и т.д.).

Масс-спектрометрические способы хорошо известны в настоящей области техники, их использовали для количественного определения и/или идентификация биомолекул, таких как белки и другие клеточные метаболиты (см., например, Li et al., 2000; Rowley et al., 2000; и Kuster and Mann, 1998).

Согласно определенным вариантам осуществления используют газофазный ионный спектрофотометр. Согласно другим вариантам осуществления масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией используют для идентификации метаболитов. Современную масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией ("LDI-MS") можно осуществить на практике в двух основных вариантах: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация ("MALDI") масс-спектрометрия и усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация ("SELDI").

В MALDI метаболит смешивают с раствором, содержащим матрицу, и каплю жидкости помещают на поверхность субстрата. Раствор матрицы затем сокристаллизуют с биомаркерами. Субстрат вводят в масс-спектрометр. Энергию лазера направляют на поверхность субстрата, где она подвергается десорбции и ионизирует белки без их существенной фрагментации. Тем не менее, MALDI имеет ограничения в качестве аналитического инструмента. Он не обеспечивает средства для фракционирования биологической жидкости, и материал матрицы может препятствовать обнаружению, особенно для низкомолекулярных аналитов.

В SELDI поверхность субстрата модифицируют так, что она является активным участником процесса десорбции. В одном варианте поверхность дериватизируют адсорбентом и/или реагентами для захвата, которые селективно связывают представляющий интерес биомаркер. В другом варианте поверхность дериватизируют поглощающими энергию молекулами, которые не десорбируются при ударе лазером. В другом варианте поверхность дериватизируют молекулами, которые связывают представляющий интерес биомаркер и которые содержат фотолитическую связь, которая разрушается при применении лазера. В каждом из этих способов дериватизирующее средство, как правило, локализуется в определенном месте на поверхности субстрата, где наносят образец. Эти два способа можно объединять, например, с использованием SELDI с аффинной поверхностью для захвата аналита (например, биомаркера) и добавления содержащей матрицу жидкости к захваченному аналиту для обеспечения поглощающего энергию материала.

Дополнительную информацию о масс-спектрометрах см., например, Principles of Instrumental Analysis, 3rd edition., Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; и Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4.sup.th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, New York 1995), pp. 1071-1094.

- 5 Согласно некоторым вариантам осуществления данные масс-спектрометрии представлены в виде масс-хроматограммы. "Масс-хроматограмма" представляет собой представление масс-спектрометрических данных в виде хроматограммы, где ось x представляет время, а ось y представляет интенсивность сигнала. Согласно одному аспекту масс-хроматограмма представляет собой хроматограмму общего ионного тока (TIC).
- 10 Согласно другому аспекту масс-хроматограмма представляет собой хроматограмму основных пиков. Согласно другим вариантам осуществления масс-хроматограмма представляет собой хроматограмму регистрации выбранных ионов (SIM). Согласно другому варианту осуществления масс-хроматограмма представляет собой хроматограмму контроля селективных реакций (SRM). Согласно одному варианту осуществления масс-
- 15 хроматограмма представляет собой экстрагированную ионную хроматограмму (EIC).

В EIC один признак отслеживают на протяжении всего опыта. Общую интенсивность или интенсивность основного пика в пределах окна допуска по массе в окрестности отношения массы к заряду конкретного аналита наносят на график в каждую точку анализа. Размер окна допусков по массе, как правило, зависит от точности массы и

20 массового разрешения прибора, собирающего данные. Используемый в настоящем документе термин "признак" относится к одному низкомолекулярному метаболиту или фрагменту метаболита. Согласно некоторым вариантам осуществления термин "признак" может также включать в себя шум при дальнейших исследованиях.

Обнаружение присутствия метаболита, как правило, будет предусматривать

25 обнаружение интенсивности сигнала. Это, в свою очередь, может отражать количество и характер биомаркера, связанного с субстратом. Например, согласно определенным вариантам осуществления интенсивность сигнала пиковых значений из спектров первого образца и второго образца можно сравнить (например, визуально, с помощью компьютерного анализа и т.д.) для определения относительных количеств конкретных

30 метаболитов. Программы системы программного обеспечения, такие как программа Biomarker Wizard (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA), можно использовать для содействия в анализе спектров масс-спектрометрии. Масс-спектрометры и их техники хорошо известны.

Специалисту в настоящей области техники понятно, что любой из компонентов

35 масс-спектрометра, например, источник десорбции, масс-анализатор, детектор и т.д. и

разнообразные препараты образцов можно комбинировать с другими подходящими компонентами или препаратами, описанными в настоящем документе, или с теми, которые известным в настоящей области техники. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный образец может содержать тяжелые атомы, например, ^{13}C , тем самым позволяя смешивать исследуемый образец с известным контрольным образцом в одном и том же опыте масс-спектрометрии. Предусмотрено подходящее стабильное изотопное мечение.

Согласно одному варианту осуществления используют масс-спектрометр с времяпролетной лазерной десорбцией (TOF). В масс-спектрометрии с лазерной десорбцией субстрат со связанным маркером вводят во впускную систему. Маркер десорбируется, и его ионизируют в газовой фазе лазером из источника ионизации. Генерируемые ионы собирают с помощью ионно-оптической сборки, а затем во времяпролетном масс-анализаторе ионы ускоряют посредством кратковременного воздействия поля высокого напряжения и оставляют дрейфовать в высоковакуумную камеру. В дальнем конце высоковакуумной камеры ускоренные ионы попадают на чувствительную поверхность детектора в разное время. Поскольку время пролета зависит от массы ионов, прошедшее время между образованием ионов и ударом о детектор ионов можно использовать для идентификации присутствия или отсутствия молекул с конкретным отношением массы к заряду.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения уровни метаболитов обнаруживают с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Способы обнаружения метаболитов также включают в себя применение поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Биосенсорную технологию SPR объединили с масс-спектрометрией MALDI-TOF для десорбции и идентификации метаболитов.

Данные для статистического анализа можно извлечь из хроматограмм (спектров сигналов масс-спектрометрии) с использованием программного обеспечения для статистических методов, известных в настоящей области техники. "Статистика" - это наука об эффективном использовании числовых данных, относящихся к группам индивидуумов или экспериментов. Способы статистического анализа хорошо известны в настоящей области техники.

Согласно одному варианту осуществления для статистического анализа используют компьютер.

Согласно одному варианту осуществления для статистического анализа используют программное обеспечение Agilent MassProfiler или MassProfilerProfessional. Согласно другому варианту осуществления для статистического анализа используют программное обеспечение Agilent MassHunter Qual. Согласно другим вариантам осуществления можно

использовать альтернативные способы статистического анализа. Такие другие статистические способы включают в себя дисперсионный анализ (ANOVA), критерий хи-квадрат, корреляционный критерий, критерий факторного анализа, U-критерий Манна-Уитни, среднее квадратичное взвешенное отклонение (MSWD), коэффициент корреляции Пирсона, регрессионный анализ, коэффициент ранговой корреляции Спирмена, t-критерий Стьюдента, критерий Крамера-Уэлча, критерий Тьюки и анализ временных рядов.

Согласно различным вариантам осуществления сигналы масс-спектрометрии можно преобразовать различными способами для улучшения производительности способа. Любые индивидуальные сигналы или сводные данные распределений сигналов (такие как среднее, медианное значение или дисперсия) можно преобразовать таким образом. Возможные преобразования включают в себя логарифмирование, возведение в некоторую положительную или отрицательную степень, например, извлечение квадратного корня или вычисление инверсии, или вычисление арксинуса (Myers, Classical and Modern Regression with Applications, 2nd edition, Duxbury Press, 1990).

Следует принимать во внимание, что как только животное было классифицировано с конкретным фенотипом (например, высокая эффективность использования кормов, низкий производитель метана), его можно отобрать (например, отделить от остальной части стада) и классифицировать как характеризующегося указанным фенотипом. Согласно одному варианту осуществления животное имеет тавро с тем, чтобы было ясно, что оно характеризуется этим фенотипом.

Согласно одному варианту осуществления животное выбирают в качестве кандидата на селекцию. Согласно другому варианту осуществления животное выбирают в качестве кандидата для производства мяса. В случае, когда обнаружено, что животное характеризуется нежелательным фенотипом (например, низкая эффективность использования кормов, высокий производитель метана), животное можно выбрать в качестве кандидата для терапии.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ увеличения эффективности использования кормов или уменьшения продукции метана жвачного животного, предусматривающий введение животному средства, которое увеличивает количество по меньшей мере одного вида бактерий, представленного в таблице 4, в микробиоме рубца животного, тем самым увеличивая эффективность использования кормов или уменьшая продукцию метана жвачного животного. Альтернативно для увеличения эффективности использования кормов (или уменьшения продукции метана) можно получить средство, которое увеличивает количество по меньшей мере одного вида рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере двух видов рода бактерий

Megasphaera, по меньшей мере трех видов рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере четырех видов рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере пяти видов рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере шести видов рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере семи видов рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере восемью видами рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере девяти видов рода бактерий *Megasphaera*, по меньшей мере десяти или больше видов рода бактерий *Megasphaera*.

Согласно настоящему изобретению предусмотрено увеличение обеспечиваемой питанием энергии или уменьшение продукции метана жвачных животных всех возрастов. Согласно конкретному варианту осуществления животные, чья обеспечиваемая питанием энергия изменяется, представляют собой новорожденных, как правило, возрастом не более одного дня. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более двух дней. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более трех дней. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 1 недели. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 2 недели. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 1 месяца. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 3 месяцев. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 6 месяцев. Согласно другому варианту осуществления возраст животных составляет не более 1, 2 или 3 лет. Согласно другому варианту осуществления животные являются взрослыми.

Согласно одному варианту осуществления средство представляет собой композицию, содержащую бактерии (микробиологическую композицию). Она содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17 или все из видов микроорганизмов, упомянутых в таблице 4.

Предпочтительно микробиологические композиции согласно этому аспекту настоящего изобретения содержат по меньшей мере два вида микроорганизмов. Согласно одному варианту осуществления микробиологические композиции согласно этому аспекту настоящего изобретения содержат меньше чем 100 видов микроорганизмов, меньше чем 500 видов микроорганизмов, меньше чем 400 видов микроорганизмов, меньше чем 300 видов микроорганизмов. Иллюстративные диапазоны видов микроорганизмов включают в себя 2-1000, 2-500, 2-250, 2-200, 2-150, 2-100, 2-90, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10.

Предпочтительно композиция содержит по меньшей мере один вид *Megasphaera* (например, *M. elsdenii*) и/или вид, характеризующийся последовательностью гена 16S рРНК, как представлено в SEQ ID NO: 4 или 12.

Относительные количества каждой бактериальной популяции в композиции можно
5 определить с использованием соответствующих систем анализа. Согласно одному варианту осуществления относительное количество бактерий *Megasphaera* превышает этот показатель в фекальном микробиоме или микробиоме рубца животного с высокой энергетической эффективностью/низкого производителя метана.

Микробиологическую композицию можно получить непосредственно из образца
10 микробиоты животного с высокой энергетической эффективностью. Альтернативно микробиологическую композицию можно искусственно создать путем добавления известных количеств различных микроорганизмов. Следует понимать, что микробиологическую композицию, полученную из образца микробиоты животного, можно обрабатывать перед введением путем увеличения количества определенного вида
15 (например, увеличения количества/или истощения количества конкретного вида, такого как *Megasphaera*). Согласно другому варианту осуществления микробиологические композиции не обрабатывают каким-либо образом, что служит для изменения относительного равновесия между микробиологическими видами и таксонами, содержащимися в них. Согласно некоторым вариантам осуществления
20 микробиологическую композицию размножаем *ex vivo* с использованием известных способов культивирования перед введением. Согласно другим вариантам осуществления микробиологическую композицию не размножают *ex vivo* перед введением.

Согласно одному варианту осуществления микробиологическую композицию не получают из фекального материала.

Согласно другому варианту осуществления микробиологическая композиция не
25 содержит (или содержит только в следовых количествах) фекальный материал (например, клетчатку).

Авторы настоящего изобретения предусматривают средства, отличные от самих микроорганизмов, которые увеличивают соотношение любой из благоприятных бактерий,
30 представленных в таблице 4. Такие средства могут представлять собой метаболиты. Метаболиты могут включать в себя лактат или сукцинат или короткоцепочечные жирные кислоты, которые могут представлять собой подгруппу жирных кислот с 6 или меньше атомами углерода в их алифатических хвостах, например, ацетат, пропионат, изобутират, изовалериановая кислота, 3-метилбутановая кислота, валериановая кислота, пентановая
35 кислота, изовалериановая кислота, изопентановая кислота и бутират. Предпочтительно

короткоцепочечная жирная кислота представляет собой пропионат, бутират, валерат и/или изовалерат. Дополнительные предусмотренные средства включают в себя гликаны, такие как крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, хрящевые, тканевые (гликозаминогликаны и N-связанные гликаны) животного происхождения и эндогенные гликаны из слизи хозяина (О-связанные гликаны).

После введения средств согласно настоящему изобретению остаточное потребление корма/продукцию метана можно измерить с тем, чтобы осуществлять мониторинг изменения. Таким образом, дозу средства можно калибровать/регулировать в соответствии с потребностями животного. Другие параметры, которые можно перепроверять, включают в себя метаболиты, летучие жирные кислоты.

До введения животное может предварительно получить лечение с помощью средства, которое уменьшает количество встречающегося в природе микробиома рубца (например, путем лечения антибиотиком). Согласно конкретному варианту осуществления лечение значительно устраняет встречающуюся в природе микрофлору рубца по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или даже 90%.

Помимо увеличения вышеупомянутых бактериальных популяций в микробиоме рубца животных, авторы настоящего изобретения дополнительно предусматривают уменьшение любого из видов бактерий, приведенных в таблице 5 в настоящем документе ниже.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ увеличения эффективности использования кормов или уменьшения продукции метана жвачного животного, предусматривающий введение животному композиции, содержащей по меньшей мере одно средство, которое специфически понижающе регулирует количество по меньшей мере одной из бактерий, приведенных в таблице 5, тем самым увеличивая эффективность использования кормов или уменьшая продукцию метана жвачного животного.

Согласно конкретному варианту осуществления средство не является антибиотиком.

Согласно другому варианту осуществления средство представляет собой антибактериальный пептид.

Согласно другому варианту осуществления средство представляет собой бактериофаг.

Согласно другому варианту осуществления средство способно понижающе регулировать критически важный ген по меньшей мере одного из видов бактерий, описанных в настоящем документе ниже.

Таким образом, например, авторы настоящего изобретения предусматривают применение мегануклеаз, таких как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) и системы CRISPR/Cas для отрицательной регуляции критически важного гена.

5 Система CRISPR-Cas – Многие бактерии и археи содержат системы приобретенного иммунитета на основе эндогенной РНК, которые могут разрушать нуклеиновые кислоты инвазивных фагов и плазмид. Эти системы состоят из генов коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), которые производят компоненты РНК, и ассоциированных с CRISPR (Cas) генов, которые кодируют белковые компоненты.

10 РНК CRISPR (срРНК) содержат короткие участки гомологии с конкретными вирусами и плазмидами и действуют как проводники, чтобы направлять Cas-нуклеазы для разложения комплементарных нуклеиновых кислот соответствующего патогена. Исследования системы CRISPR/Cas II типа *Streptococcus pyogenes* показали, что три компонента формируют комплекс РНК/белок и вместе являются достаточными для активности

15 специфической в отношении последовательности нуклеазы: нуклеаза Cas9, срРНК, содержащая 20 п.н. гомологии в отношении целевой последовательности, и транс-активирующая срРНК (tracrPНК) (Jinek et al. *Science* (2012) 337: 816–821.). Дополнительно продемонстрировали, что синтетическая химерная гидовая РНК (гРНК), состоящая из слияния между срРНК и tracrPНК, могла направлять Cas9 для расщепления ДНК-мишеней,

20 которые являются комплементарными срРНК in vitro. Кроме того, продемонстрировали, что транзистентную экспрессию Cas9 в сочетании с синтетическими гРНК можно использовать для получения нацеленных двухцепочечных разрывов у многих различных видов (Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; DiCarlo et al., 2013; Hwang et al., 2013a,b; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013).

25 Система CRISPR/Cas для редактирования генома содержит два отдельных компонента: гРНК и эндонуклеазу, например, Cas9.

гРНК, как правило, представляет собой 20 нуклеотидную последовательность, кодирующую комбинацию целевой гомологичной последовательности (срРНК) и эндогенной бактериальной РНК, которая соединяет срРНК с нуклеазой Cas9 (tracrPНК) в

30 единый химерный транскрипт. Комплекс гРНК/Cas9 включается в целевую последовательность путем спаривания оснований между последовательностью гРНК и комплементарной геномной ДНК. Для успешного связывания Cas9 геномная целевая последовательность также должна содержать правильную последовательность мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM), сразу после целевой последовательности.

35 Связывание комплекса гРНК/Cas9 локализует Cas9 на геномной целевой

последовательности так, чтобы Cas9 могла разрезать обе цепи ДНК, вызывая двухцепочечный разрыв. Как и в случае с ZFN и TALEN, двухцепочечные разрывы, произведенные CRISPR/Cas, могут подвергаться гомологичной рекомбинации или NHEJ (негомологичному соединению концов).

5 Нуклеаза Cas9 содержит два функциональных домена: RuvC и HNH, каждый из которых разрезает различную цепь ДНК. Если оба из этих доменов активны, Cas9 вызывает двухцепочечные разрывы в геномной ДНК.

Существенное преимущество CRISPR/Cas состоит в том, что высокая эффективность этой системы в сочетании со способностью легко создавать синтетические
10 гРНК позволяет одновременно нацеленно воздействовать сразу на несколько генов. Кроме того, большинство клеток, несущих мутацию, представляют собой биаллельные мутации в целевых генах.

Тем не менее, кажущаяся гибкость во взаимодействиях спаривания оснований между последовательностью гРНК и целевой последовательностью геномной ДНК
15 допускает несовершенные совпадения с целевой последовательностью, которая должна быть разрезана с помощью Cas9.

Модифицированные версии фермента Cas9, содержащие один неактивный каталитический домен, либо RuvC-, либо HNH-, называются 'никазами'. Только с одним активным нуклеазным доменом никаза Cas9 разрезает только одну цепь целевой ДНК,
20 создавая одноцепочечный разрыв, или 'ник'. Одноцепочечный разрыв, или 'ник', в норме быстро репарируется посредством пути HDR, используя интактную комплементарную цепь ДНК в качестве матрицы. Однако два проксимальных одноцепочечных разрыва на противоположных цепях, введенных никазой Cas9, приравниваются к двухцепочечному разрыву в том, что часто называют системой CRISPR с 'двойным одноцепочечным
25 разрывом'. Двойной одноцепочечный разрыв можно репарировать с помощью либо NHEJ, либо HDR в зависимости от требуемого эффекта на генную мишень. Таким образом, если специфичность и сниженные эффекты нецелевого воздействия имеют решающее значение, использование никазы Cas9 для создания двойного одноцепочечного разрыва путем конструирования двух гРНК с целевыми последовательностями в непосредственной
30 близости и на противоположных цепях геномной ДНК уменьшало бы эффект нецелевого воздействия, так как любая гРНК отдельно будет приводить к появлению одноцепочечных разрывов, которые не изменят геномную ДНК.

Модифицированные версии фермента Cas9, содержащие два неактивных каталитических домена (мертвый Cas9 или dCas9), не обладают нуклеазной активностью,
35 хотя могут связываться с ДНК на основании специфичности гРНК. dCas9 можно

использовать в качестве платформы для регуляторов транскрипции ДНК для активации или подавления экспрессии генов путем слияния неактивного фермента с известными регуляторными доменами. Например, связывание dCas9 отдельно с целевой последовательностью в геномной ДНК может препятствовать транскрипции гена.

5 Существует ряд инструментов, находящихся в открытом доступе, которые помогают выбирать и/или разрабатывать целевые последовательности, а также перечни биоинформационно определенных уникальных гРНК для различных генов у разных видов, такие как Target Finder лаборатории Feng Zhang, Target Finder лаборатории Michael Boutros (E-CRISP), инструменты RGEN: Cas-OFFinder, CasFinder: гибкий алгоритм для
10 идентификации специфических для Cas9 мишеней в геномах, и CRISPR Optimal Target Finder.

Для использования системы CRISPR как гРНК, так и Cas9 должны экспрессироваться в целевой клетке. Инсерционный вектор может содержать обе кассеты на одной плазмиде, или кассеты экспрессируются из двух отдельных плазмид. Плазмиды
15 CRISPR являются коммерчески доступными, такие как плаزمида px330 от Addgene.

Микробиологическую композицию можно вводить саму по себе (например, с использованием катетера или шприца) или можно вводить вместе с кормом (например, в качестве кормовой добавки) для животного или напитка для животного.

Этих жвачных животных можно кормить с помощью композиции кормовой добавки
20 согласно настоящему изобретению в любое время и в любом количестве в течение их жизни. Иными словами, жвачное животное можно кормить композицией кормовой добавки согласно настоящему изобретению либо самой по себе, либо в качестве части рациона, который включает другие кормовые продукты. Кроме того, жвачное животное можно кормить композицией кормовой добавки согласно настоящему изобретению в любое время
25 в течение его жизни. Жвачное животное можно кормить композицией кормовой добавки согласно настоящему изобретению постоянно, через регулярные промежутки времени или периодически. Жвачное животное можно кормить композицией кормовой добавки согласно настоящему изобретению в таком количестве, чтобы на ее долю приходился весь корм, большая или меньшая доля корма в рационе жвачного животного в течение любого
30 периода времени в жизни животного. Согласно одному варианту осуществления жвачное животное кормят композицией кормовой добавки согласно настоящему изобретению в количестве, так что на нее приходится большая часть корма в рационе животного в течение значительной части жизни животного.

Примеры дополнительных активных кормовых добавок для рубца, которые можно
35 получить вместе с кормовой добавкой согласно настоящему изобретению, включают в себя

буферы, ферментируемые остатки, эфирные масла, поверхностно-активные средства, мონензин натрия, органические кислоты и дополнительные ферменты.

Кроме того, предусмотрена инкапсуляция микроорганизмов в наночастицах или микрочастицах с использованием способов, известных в настоящей области техники, включая в себя способы, описанные в EP085805, EP1742728 A1, WO2006100308 A2 и US 6449916, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции можно вводить перорально, ректально или любым другим путем, который является благоприятным для животного, так чтобы микроорганизмы достигали рубца животного.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение предусматривает новые способы выращивания жвачного животного путем кормления жвачного животного такой композицией кормовой добавки.

Прежде чем подробно пояснить по меньшей мере один вариант осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено в его применении деталями, изложенными в последующем описании или проиллюстрированными примерами. Настоящее изобретение может предусматривать другие варианты осуществления, или его можно осуществить на практике или выполнить различными путями. Кроме того, следует понимать, что формулировки и терминология, используемые в настоящем документе, предназначены для описания и не должны рассматриваться как ограничивающие.

Дополнительные цели, преимущества и новые признаки настоящего изобретения станут очевидными для среднего специалиста в настоящей области техники при рассмотрении следующих примеров, которые не предназначены для ограничения. Кроме того, каждый из различных вариантов осуществления и аспектов настоящего изобретения, описанных выше и заявленных в разделе формулы изобретения ниже, находит экспериментальную поддержку в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

Ниже приведена ссылка на следующие примеры, которые вместе с вышеприведенными описаниями иллюстрируют настоящее изобретение неограничивающим образом.

Как правило, номенклатура, используемая в настоящем документе, и лабораторные процедуры, используемые в настоящем изобретении, включают в себя молекулярные, биохимические, микробиологические техники и техники рекомбинантной ДНК. Такие техники подробно описаны в литературе. См., например, "Molecular Cloning: A laboratory

Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методики представлены в патентах США №№ 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступные иммуноанализы подробно описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США №№ 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) и "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); все из которых полностью включены посредством ссылки в настоящий документ. Другие общие ссылки приведены по всему настоящему документу. Считается, что представленные в них процедуры хорошо известны в настоящей области техники и предназначены для удобства читателя. Вся содержащаяся в них информация включена в настоящий документ посредством ссылки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн испытания: Для эксперимента выбрали 146 голштино-фризских молочных коров. Коров с заболеваниями, выкидышами и беременностями двойней в истории или находящихся выше первого триместра беременности не включали в эксперимент. Экспериментальная молочная ферма оснащена оборудованием, специально разработанным для индивидуального мониторинга всех функций животного, потребления корма и различных физиологических параметров. Животных разделили на 7 групп в соответствии с периодом лактации, так что каждая корова находилась между 50 - 150 днями лактации при

мониторинге. Каждая группа содержала от 19 до 21 коров, которых подвергали мониторингу в течение 42-49 дней. Животных кормили *ad libitum* стандартной диетой для дойных коров, состоящей из 30% грубого корма и 70% концентрата, животные имели свободный доступ к воде. Коров приучали к вышеупомянутой диете в течение 3 недель до начала эксперимента, так чтобы они привыкли к их индивидуальному откормочному пункту.

Следующие параметры подвергали автоматическому мониторингу три раза в день во время эксперимента: потребление сухого вещества (DMI; кг), масса (кг), удой молока (кг), содержание в молоке лактозы, жира и белка (г) и количество соматических клеток с использованием программы Afimilk (Afimilk Ltd., Kibbutz Afikim, Israel). Образцы молока отправляли в уполномоченную лабораторию качества молока (National Service for Udder Health and Milk Quality, Caesarea, Israel) три раза для каждой группы для верификации анализа программы Afimilk. Оценку упитанности в баллах (BCS) проводил один раз в неделю один и тот же человек на протяжении всего эксперимента.

Параметры эффективности использования кормов, остаточное потребление корма (RFI) и коэффициент конверсии корма (CR) рассчитывали в соответствии с формулами Национального исследовательского совета (National Research Council) (2001). В целях повышения статистической мощности по сравнению со случайной выборкой применяли подход к выборке экстремальных фенотипов (Li *et al.*, 2011). Двенадцать коров с самыми экстремальными и стабильными значениями RFI выбирали из каждой группы для отбора образцов сока рубца, шесть с низкими значениями и шесть с высокими значениями RFI. Критерий Тьюки использовался для подтверждения того, что значение RFI каждой коровы являлось устойчивым на протяжении всего эксперимента и значительно отличалось от коров в группе противоположной эффективности. В целом, 78 коров выбирали для отбора образцов, и они представляли 25% наиболее эффективных и 25% наиболее неэффективных животных всей когорты ($P < 0,0001$; фигура 8).

Сбор образцов: Образцы рубца собирали 3 дня подряд. Образцы от коров собирали через 6 часов после кормления, в течение которых им не предлагали корм; 500 мл содержимого рубца собирали с использованием желудочного зонда из нержавеющей стали с вакуумным пробоотборником для рубцов, и сразу определяли pH. Образцы для экстракции ДНК и метаболита быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до анализа. Образцы рубца для метаболических анализов фильтровали через шесть слоев ситовой ткани для удаления крупных частиц корма, переносили в содержащие CO_2 бутылки и промывали CO_2 для поддержания анаэробных условий. Сразу же после сбора образцы

рубца поддерживали при температуре 39°C вплоть до 1 часа до использования и обрабатывали в лаборатории, расположенной в 100 метрах.

Свежие образцы фекалий получали 3 раза в день в течение 4 дней подряд. Образцы немедленно замораживали при -20°C.

5 ***In vitro анализ переваримости:*** *In vitro* переваримость волокон клеточных стенок растений, представленных нейтрально расщепляемой клетчаткой (NDF) или общими полимерами корма (в сухом веществе), определяли в соответствии с двухэтапной технологией Tilley и Terry (Tilley & Terry, 1963). Вкратце, корм для коров сушили в течение 72 часов в вентилируемой печи с температурой 60°C и затем измельчали, чтобы он прошел
10 через 1 мм сито. Корм инкубировали с соком рубца и буфером для искусственного рубца в запаянных стеклянных пробирках.

Буфер для искусственного рубца составляли, как описано ранее (McDougall, 1948, Tilley & Terry, 1963). Вкратце, 100 мл буфера А [98 г NaHCO₃, 93 г NaHPO₄·12H₂O, 5,7 г KCl, 4,7 г NaCl, 1,2 г MgSO₄·7H₂O, добавленные к DDW до конечного объема,
15 составляющего 1 л], добавляли к 800 мл DDW. Раствор промывали струей CO₂ для снижения pH до 6,8-7,0. Затем 1 мл буфера В [40 г CaCl₂, добавленные к DDW до конечного объема, составляющего 1 л], 50 мл буфера С [30 г NH₄HCO₃, добавленные к DDW до конечного объема, составляющего 1 л] и 100 мкл буфера D [10 г MnCl₂·4H₂O, 1 г CoCl₂·6H₂O, 8 г FeCl₃·6H₂O, добавленные к DDW до конечного объема, составляющего 1
20 л] добавляли и буфер доводили до конечного объема, составляющего 1 л, с помощью DDW.

Пробирки промывали струей CO₂ и закрывали крышкой обратного клапана, которая позволяла пропускать газ только из пробирки. Пробирки инкубировали в течение 24 или 48 ч при 39°C и встряхивали пять раз в день с последующей инкубацией с кислым пепсином. По окончании этой процедуры непереваренные твердые вещества осаждали
25 центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин и высушивали в вентилируемой печи при 60°C в течение 72 часов. Осадки использовали для определения остаточного сухого вещества (DM) путем взвешивания или для определения остаточного NDF, следуя процедуре Van Soest *et al.* (Van Soest *et al.*, 1991). Результаты выражают как среднюю переваримость корма в рубце от двух последовательных дней отбора образцов.

30 ***In vivo переваримость:*** Произвольно взятые образцы фекалий объединяли для каждой коровы, высушивали при 60°C в течение 72 ч в печи с принудительной подачей воздуха и измельчали, чтобы они прошли через 1 мм сито. Содержание непереваренной NDF определяли в рационе и в образцах фекалий в соответствии с ранее описанным способом (Lippke *et al.*, 1986) после инкубации с соком рубца в течение 72 часов и
35 использовали в качестве внутреннего маркера для анализа кажущейся переваримости DM

всего пищеварительного тракта. In vivo переваримость DM и NDF рациона каждой коровы рассчитывали с использованием ее среднего поглощения с кормом DM и выхода фекалий.

In vitro анализ выделения метана

Образцы разбавляли 1:2 (объем./объем.) буфером искусственного рубца. Двойные повторности по 5 мл аликвот из каждого разбавленного образца переносили в стеклянные пробирки с навинчивающейся крышкой (ISI, Israel Scientific Instruments Ltd., Petah-Tikva, Israel), подходящие для измерения метана с использованием системы GC (HP-5890 серия II, детектор FID). Образцы инкубировали при 39°C в течение 24 ч с 0,5 г DM корма, а затем анализировали с помощью GC в отношении выделения метана. Образцы по 0,5 мл газа из рабочего пространства пробирки вводили в 182,88 см x 0,3175 см x 2,1 см заполненную колонку 5A Supelco analytical с молекулярным ситом 45/60 (Sigma-Aldrich) с гелием в качестве газа-носителя, скорость потока которого устанавливали на 10 мл/мин, и температура термостата составляла 200°C. Температура термостата оставалась неизменной в течение всего времени анализа, составляющего 5 мин. Стандартную кривую получали с использованием чистого газа метана.

Продукцию метана количественно определяли для 36 образцов микробиома рубца животных с наиболее экстремальным фенотипом групп определения эффективности использования кормов (18 эффективных и 18 неэффективных), с двумя биологическими повторами для каждого животного.

Идентификация и количественное определение метаболитов сока рубца:

Замороженные образцы сока рубца оттаивали при 25°C и центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Супернатант фильтровали через стерильный 0,45 мкм фильтр (EMD Millipore). Образцы сока рубца хранили на льду в течение экстракции метаболитов в конвейере идентификации метаболитов и их количественного определения в GC-MS и GC для минимизации разрушения метаболитов.

Образцы рубца анализировали с помощью GC-MS в отношении полярных метаболитов и с помощью GC с детектором FID в отношении SCFA. Протокол экстракции и дериватизации для анализа GC-MS адаптировали из ранее описанного способа (Saleem *et al.*, 2013). Дериватизированные экстракты анализировали с использованием системы для газовой хроматографии Agilent 5975C GC и системы для масс-спектрометрии Agilent 7890A MS, работающих в режиме ионизации электронным ударом (EI). Аликвоты (1 мкл) вводили (без разделения) в 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм колонку HP-5MS Ultra Inert column (Agilent Technologies) с газом-носителем гелием с установленной скоростью потока, составляющей 1 мл/мин, и начальной температурой термостата, составляющей 70°C. Температуру термостата поддерживали постоянной при начальной температуре в течение 2 мин, а затем

увеличивали со скоростью 10°C/мин до конечной температуры, составляющей 310°C и конечное время анализа составляло 45 мин. Образцы анализировали с использованием полного сканирования в диапазоне масс 50-500 m/z (1,7 сканирований/с) с задержкой обнаружения, составляющей 4 мин. Индексы удерживания рассчитывали с использованием стандартного раствора смеси C8-C20-алканов (Sigma-Aldrich) в качестве внешнего стандарта. Количественное определение и идентификацию триметилсилилированных метаболитов проводили с использованием базы данных NIST и стандартов квалификации ВЭЖХ.

Для идентификации и количественного определения SCFA 400 мкл отфильтрованного сока рубца смешивали с 100 мкл 25% раствора метафосфорной кислоты (масс./объем. в бидистиллированной воде) и перемешивали вихревым способом в течение 1 мин. Образцы инкубировали при 4°C в течение 30 мин и после центрифугировали в течение 15 мин при 10600 g. Супернатант декантировали в новые пробирки, затем добавляли 250 мкл метил-трет-бутилового эфира (MTBE) (Sigma-Aldrich) и пробирки перемешивали вихревым способом в течение 30 с. Другой цикл центрифугирования проводили в течение 1 мин при 10600 g. Верхнюю фазу, содержащую MTBE + SCFA, анализировали с использованием системы GC Agilent 7890B с детектором FID. Температура на входе и детекторе составляла 250°C и 300°C, соответственно. Аликвоты (1 мкл) вводили с отношением деления потока, составляющим 1:25, в колонку 30 м x 0,32 мм x 0,25 мкм ZB-FFAP (ZEBRON) с газом-носителем гелием, скорость потока которого устанавливали при 2,4 мл/мин, и начальной температурой термостата, составляющей 100°C. Температуру термостата поддерживали постоянной при начальной температуре в течение 5 мин, а затем повышали со скоростью, составляющей 10°C/мин, до конечной температуры, составляющей 125°C, и конечное время анализа составляло 12,5 мин.

Количественное определение и идентификацию метаболитов проводили с использованием стандартов квалификации для ВЭЖХ. Все метаболиты нормировали к содержанию органического вещества в соке рубца, из которого их экстрагировали. Образцы рубца фильтровали через стерильный 0,45 мкм мембранный фильтр Supor Membrane (PALL Life Sciences). Содержание органического вещества в образцах рубца анализировали с помощью анализатора общего содержания органического углерода (TOC) в продуктах сгорания Formacs (Skalar, De Breda, Netherlands).

Экстракция микробиологической ДНК: Микробиологическую фракцию рубца разделяли согласно Stevenson и Weimer (Stevenson & Weimer, 2007), с незначительными модификациями в соответствии с потребностями этих экспериментов, как описано в Jami

et al. (Jami *et al.*, 2013). Экстракцию ДНК проводили, как описано Stevenson и Weimer (Stevenson & Weimer, 2007).

Секвенирование ДНК методом дробовика и анализ: Библиотеки метагеномных ДНК конструировали с помощью набора для получения образцов TruSeq DNA Sample Prep kit (Illumina). Библиотеки объединяли и секвенировали по двум полосам в течение 151 цикла с каждого конца на HiSeq2500 (Illumina) и обрабатывали с помощью Casava 1.8.2 (Illumina). В среднем для каждого образца получали 35581041 ± 6899269 парных прочтений и в общей сложности получили 2775321186 парных прочтений. 18,6% прочтений не прошли фильтрацию и удаление артефактов с использованием конвейера MOCAT (Kultima *et al.*, 2012).

Для получения более полного метагенома создали объединенную сборку всех данных от 78 коров. Это компенсировало более низкую глубину секвенирования каждого отдельного образца и любую систематическую погрешность, вызванную сборкой отдельных образцов. Прочтения от всех образцов объединяли и собирали в один метагеном, с использованием CLC Bio, пакета CLC Assembly Cell версии 3.2.2 с K-mer = 21 и параметрами по умолчанию; получили 16784830 контигов. Конвейер QC дупликации и скрининг в отношении прочтений *Bos Taurus* проводили с использованием конвейера MG-RAST. Никаких избыточностей не было обнаружено, и 0,43% контигов отбросили после удаления примесей *Bos taurus*. Филогенетическое происхождение каждого контига снабжали аннотацией базы данных RefSeq (Pruitt *et al.*, 2007) ($E \leq 10^{-5}$) с использованием конвейера MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008).

Распознавание генов проводили на контигах с использованием FragGeneScan (Rho *et al.*, 2010); всего идентифицировали 21531511 генов. Прочтения каждого образца набирали по всем генам с использованием BWA (Li & Durbin, 2009) с 98% идентичностью и параметрами по умолчанию; порог одного прочтения для идентификации гена выбирали для включения в анализ редких генов. В среднем 52,4% прочтений из каждого образца сопоставляли с полученными генами без различий между группами эффективности (фигура 9). В каждом образце идентифицировали в среднем 4079212 генов, относительную численность определенного гена рассчитывали по числу прочтений, набранных однозначно, нормализованных по длине гена и общим прочтениям, полученным из образца. Число обнаруженных генов не зависело от числа сопоставленных прочтений (фигура 10).

Секвенирование и анализ 16S рДНК

Область 16S V3 амплифицировали с использованием праймеров 357F CCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO: 20) и 926R CCGTCAATTCMTTTRAGT (SEQ ID NO: 21) (Peterson *et al.*, 2009). Библиотеки объединяли и секвенировали на одной проточной

кувете MiSeq (Illumina) в течение 251 цикла с каждого конца фрагментов и анализировали с помощью Casava 1.8. Всего 49760478 спаренных прочтений получили в течение всех 3 дней отбора образцов, с средним по 212652 прочтений на образец в день.

Контроль качества данных и анализы проводили с использованием конвейера QIIME версии 1.7.0 (Caporaso *et al.*, 2010). Виды устанавливали при 97% идентичности с использованием UCLUST (Edgar, 2010). Отнесение вида к определенному таксону проводили с использованием BLAST по справочной базе данных 16S рРНК RDP (версия 10) (Cole *et al.*, 2003). Все объекты-одиночки и случайные повторения удаляли из набора данных, что давало в результате 81000 видов со средним значением 5039 на образец. Виды сгруппировали на различных таксономических уровнях для получения относительной численности таксонов для каждого филогенетического уровня (фигура 11).

Анализ биоразнообразия: Разнообразие в пределах образца (альфа) рассчитывали с использованием индекса Шеннона и доминирование определяли согласно 1 – индекс Симпсона (Haeger, 1999). Индексы профилей генов 16S рРНК рассчитывали с использованием бутстреппинга с 9999 повторностями. Насыщенность генов и таксонов представляли в виде простого подсчета генов и таксонов.

Идентификация дифференциальных видов и генов: Статистическую значимость различий в отношении относительной численности видов и генов между группами эффективности анализировали с помощью критерия суммы рангов Уилкоксона, объединенного с подходом бутстреппинга, заимствованного из Le Chatelier *et al.* (Le Chatelier *et al.*, 2013): 70% всей отобранной когорты случайным образом выбирали 30 раз, и значение определили при $P \leq 0,05$ с бутстрепом = 0,8 в качестве порогового значения. Этот процесс повторяли с еще 30 итерациями на 48 коровах с самым экстремальным фенотипом (24 эффективные и 24 неэффективные). В целом, 18 значимо различных видов и 34166 значимо различных генов, общих для всех 60 испытаний, дополнительно проанализировали ($P < 0,05$). Проводили корреляцию видов и генов, которые являлись значимо различными, с параметром RFI с использованием корреляции Спирмена. Функциональную аннотацию значимых генов осуществляли с использованием BLASTP с $E \leq 10^{-6}$ по базам данных KEGG PATHWAY, MODULE, BRITE, GENES и ORTHOLOGY (2014, 46% аннотации) (Kanehisa *et al.*, 2011). Эти гены также подвергали BLAST по базе данных NR (Pruitt *et al.*, 2007), и их филогенетическую аннотацию определяли в соответствии с лучшим результатом (BLASTP с $E \leq 10^{-6}$; 89% аннотации).

Статистические критерии и оценка уровня ложноположительных результатов: Критерии Тьюки, t-критерий Стьюдента и критерий суммы рангов Уилкоксона проводили в зависимости от нормальности распределения входных данных.

Все критерии корректировали с учетом уровня ложноположительных результатов с использованием способа, описанного Benjamini *et al.* (Benjamini & Hochberg, 1995), если не указано иное. В перестановочном t-критерии значимость разницы между средними выводили путем выполнения t-критерия между двумя группами и сравнения полученной t-статистики с t-статистикой, полученной из 9999 перестановок случайных распределений по группам (двухсторонний критерий, $P < 0,05$) (Davis, 1986). Для коррекции гипотезы для многомерных данных распределение P -значений t-критерия сравнивали с распределением самых низких P -значений, полученным из 9999 перестановок случайных распределений по группам в соответствии с Westfall и Young (Westfall & Young, 1993). Эту процедуру выполняли с использованием пакета R bioconductor package multtest (K. S. Pollard *et al.*, 2005), функции *mt.maxT*, индивидуально для каждого метаболического анализа или анализа на активность, а именно анализа полимеров, SCFA, метана и всех других измеренных метаболитов. Сходство дисперсий исследовали там, где это требуется статистическим критерием.

Прогнозирование различных физиологических параметров: Выбор признаков видов микроорганизмов и генов проводили путем выбора видов или генов, которые являлись значимо различными по своему присутствию/отсутствию с использованием точного критерия Фишера. Виды и гены сортировали отдельно в соответствии с их P -значениями в порядке возрастания и группировали в бины из 100 признаков. Каждый бин использовали в качестве прогностических признаков фенотипа эффективности использования кормов с использованием алгоритма KNN (Aha, 1997) с $k = 3$. Среднюю точность прогнозирования рассчитывали с использованием перекрестной проверки 1000 итераций для каждого бина, в котором 70% образцов использовали в качестве обучающего набора, а остальные 30% использовали в качестве исследуемого набора для измерения точности прогнозирования. Изменение размера бина (бины размером в диапазоне от 50 до 1000 функций на бин) не повлияло на точность прогнозирования. Чтобы проверить значимость точности классификаций, использовали технику перестановок. Процедуру классификации повторяли 100 раз, каждый раз после случайной перетасовки (перестановки) меток образцов. Затем P -значение для каждой точности классификации получали по процентному отношению перестановок, в которых достигнутая точность была больше, чем точность классификации, достигнутая с исходными, не подвергнутыми перестановке данными. Ту же самую методику прогнозирования, определение точности и P -значения применяли к нескольким другим метаболическим параметрам: CR, удой молока, энергетическая ценность молока, содержание лактозы молока, жира молока, белка

молока, BCS, pH и DMI. Для каждого прогностического теста метаболического параметра коров разделили на две группы по среднему значению физиологического параметра.

Для каждого физиологического индекса получали графики зависимости чувствительности от частоты ложноположительных заключений (ROC) и измерения площади под кривой (AUC) получали на основании среднего значения 1000 итераций перекрестной проверки с помощью KNN. Анализ проводили с помощью класса Metrics, который является частью платформы машинного обучения SKLEARN python.

Набор в микробиологические геномы и метаболические пути: Проводили подвыборку прочтений от каждого образца в соответствии с образцом с наименьшим числом прочтений (21000000). Прочтения из каждого образца выравнивали с использованием программы BWA с набором данных 59 геномов микроорганизмов, загруженных из NCBI с использованием BWA с 98% идентичностью и параметрами по умолчанию. Прочтения также набирали в метаболические пути значимо различных метаболитов ($P < 0,05$) с использованием того же способа. База данных авторов настоящего изобретения состояла из всех возможных ферментов KEGG для каждого метаболического пути. Номера согласно EC, используемые для каждого метаболического пути, описаны в таблице 1 в настоящем документе ниже.

Таблица 1

Ацетат	Бутират	Пропионат	Валерат	Изовалерат	Лактат	Метан
2.8.3.8	2.7.2.7	1.3.8.7	1.2.1.19	1.1.1.26	1.1.1.27	1.12.98.1
	2.8.3.8	2.8.3.1	1.2.1.3	1.2.1.24	1.1.1.28	1.12.98.2
		4.1.1.41	1.2.1.5	1.2.1.3	1.13.12.4	1.2.99.5
		4.2.1.54	1.2.1.47	1.2.1.4	1.2.1.2	1.5.1
		5.4.99.2	1.2.3.1	1.2.1.5	3.1.2.6	1.5.98.1
		51.99.1	1.2.1.8	1.2.1.77	4.2.1.130	1.5.98.2
			2.8.3.8	1.2.1.8		1.8.98.1
			3.1.1.1	1.2.7.5		2.1.1.86
			3.1.1.22	3.1.1.8		2.8.4.1
			3.1.1.8	3.1.2.20		23.1.101
				3.5.5.5		3.5.4.27
				3.5.5.7		

Существование акрилатного пути продукция пропионат в геномах исследованных утилизаторов лактата *Selenomonas ruminantium* и *Anaerovibrio lipolyticus* дополнительно исследовали, подвергая их BLAST по всем возможным ферментам KEGG, принадлежащим к акрилатному пути (ЕС 1.3.8.7, 2.8.3.1 и 4.2.1.54) с использованием порогового значения более 70% идентичности, 70% длины выравнивания исследуемого гена и $E \leq 10^{-5}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Построение справочного набора данных метагенома рубца

Чтобы определить, существуют ли признаки микробиома, ассоциированные с энергетической эффективностью коровы, сначала определяли эффективность использования кормов 146 голштино-фризских коров. Каждое животное подвергали автоматическому мониторингу в отношении нескольких параметров, используемых для расчета эффективности использования кормов (с использованием подхода RFI). Для дальнейших анализов выбирали верхние и нижние 25% животных, которые проявляли экстремальные значения эффективности использования кормов, в общей сложности 78 животных - 40 эффективных и 38 неэффективных (фигура 8). Образцы метагеномных ДНК микробиомов рубца этих животных подвергали секвенированию генов 16S рРНК и секвенированию всего генома методом дробовика. Все метагеномные прочтения всех образцов объединяли и собирали, а спрогнозированные гены служили справочным набором данных (Материалы и методы). Метагеном содержал 96,72% бактериальных последовательностей, 1,73% архейных последовательностей и 1,34% эукариотических последовательностей, аналогично тому, что было описано ранее для метагеномов микробиома рубца (Brulc *et al.*, 2009). Ни одна из эукариотических последовательностей не показала значимости в анализах.

Признаки микробиома отличаются и могут спрогнозировать фенотип эффективности использования кормов

Сравнение насыщенности микробиома у всех животных выявило значимо более низкую насыщенность в микробиомах эффективных коров как в отношении видов ($P = 0,0049$), так и содержания генов ($P = 0,0023$; фигуры 1A-B). Различия в насыщенности таксонов являлись очевидными вплоть до уровня типа (фигура 1C), что дополнительно подчеркивало интенсивность этого явления. Состав таксонов и содержание генов получали из двух различных процедур секвенирования и анализа, и поэтому согласие между этими результатами подчеркивает надежность наблюдения. Различия в насыщенности также сопровождалась значимо более низким разнообразием и более высоким доминированием в

микробиомах эффективных животных на уровне видов и генов ($P < 0,01$ и $P < 0,05$, соответственно, как для разнообразия, так и для доминирования; фигуры 1D и 1G и таблица 2).

Таблица 2

Неэффективные	Эффективные	Индекс разнообразия
$6,092 \pm 0,03$	$5,87 \pm 0,05$	Виды альфа-разнообразия**
$14,53 \pm 0,028$	$14,32 \pm 0,06$	Гены альфа-разнообразия**
$0,0079 \pm 0,0003$	$0,01 \pm 0,001$	Виды доминирования*
$0,86 \times 10^{-21} \pm 6,15 \times 10^{-23}$	$1,14 \times 10^{-21} \pm 9,72 \times 10^{-23}$	Гены доминирования*

5

Эти различия являлись очевидными до уровня семейства (фигура 12A-B). Эти различия в микробиомах эффективных и неэффективных коров порождали вопрос о том, можно ли использовать признаки микробиома в качестве маркеров для характеристики эффективности использования кормов.

10 Вследствие этого состав видов и генов микробиомов рубца использовали для успешного прогнозирования фенотипов эффективности использования кормов животных с точностью вплоть до 91% с использованием алгоритма k-ближайших соседей (KNN) (Aha, 1997). Для процесса выбора признаков использовали точный критерий Фишера для измерения различий в присутствии/отсутствии между микробиомами эффективных и

15 неэффективных животных. Виды и гены ранжировали отдельно в соответствии с их P -значениями в порядке возрастания и разделяли на бины по 100 признаков, которые использовали для прогнозирования. Каждый бин испытывали в отношении его способности прогнозировать высокую или низкую эффективность использования кормов. Среднюю точность прогнозирования рассчитывали с использованием перекрестной проверки для

20 каждого бина (1000 итераций). Точность прогнозирования первого бина вида составляла 80%, в то время как первый бин гена достиг точности 91% (фигура 2A-B). Точность прогнозирования вида снижалась до 50% (точность случайной догадки) после пятого бина, тогда как снижение точности прогнозирования для генов сопровождалось гораздо более умеренным наклоном, при этом первые четыре прогностических бина характеризовались

25 выше 90% точности с очень значительными P -значениями. Эти различия в наклоне точности прогнозирования могут быть обусловлены тем фактом, что каждый вид представляет собой один геном, содержащий тысячи генов, поэтому более стремительно снижается по сравнению с бинами, состоящими из сотен одиночных генов.

Признаки микробиома также являлись очень прогностическими для других физиологических параметров, таких как содержание лактозы в молоке и удой молока (фиг. 13А-I и 14А-I). Чувствительность и специфичность прогностических бинов дополнительно оценивали путем проведения анализа «операционных характеристик приемника» (ROC) для первых пяти бинов для данных в отношении как видов, так и генов каждого физиологического параметра (фигуры 15А-J и 16А-J). Этот анализ показал высокую чувствительность и специфичность прогнозов физиологических признаков хозяина на основе этих признаков микробиома, поскольку индекс площади под кривой (AUC) имел высокие значения, которые считаются хорошими для данных в отношении видов, и отлично подходят для данных в отношении генов ($AUC > 0,8$, $AUC > 0,9$, соответственно). Эта высокая точность прогнозирования указывала на то, что различия в содержании генов и таксономическом составе микробиома можно использовать для классификации и прогнозирования энергетической эффективности коровы.

Метаболическая активность микробиома варьируется у коров с различной эффективностью использования кормов

Разнообразие, насыщенность и доминирование являются ключевыми экологическими детерминантами, которые, если их изменить в данной экосистеме, как предполагают, окажут заметное влияние на ее функциональность (Hooper *et al.*, 2005). Следовательно, следуя результатам очевидных различий в этих параметрах (фигура 1, фигуры 12А-В и таблица 2), дополнительно исследовали функциональность экосистемы рубца. Провели несколько анализов микробиологической активности, а также серию из 41 метаболита подвергли нацеленному воздействию и измерению, представляя процессы и продукты различных трофических уровней микробиома рубца у эффективных и неэффективных коров, начиная с разложения проглоченного растительного волокна до конечных продуктов (фигура 3).

Значительные различия обнаружили в большинстве SCFA. Из шести измеренных SCFA, четыре – пропионат, бутират, валерат и изовалерат – находились в более высоких концентрациях в рубце эффективных коров (фигура 3, конечные продукты метаболизма и таблица 3).

Таблица 3

Метаболит	Эффективные (мМ)	Неэффективные (мМ)	Эффективные (мМ на г/л ОМ)	Неэффективные (мМ на г/л ОМ)
Ацетат	35,61 ± 1,24	33,26 ± 1,55	11,84 ± 0,26	11,1 ± 0,42
Пропионат	22,32 ± 0,82	19,45 ± 0,84	7,45 ± 0,23 ^a	6,49 ± 0,22 ^b

Изобутират	$1,5 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,06$	$0,5 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,02$
Бутират	$22,03 \pm 1,16$	$19,6 \pm 0,9$	$7,25 \pm 0,27^a$	$6,52 \pm 0,22^b$
Изовалерат	$2,94 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,13$	$0,97 \pm 0,03^a$	$0,84 \pm 0,04^b$
Валерат	$3,75 \pm 0,14$	$3,15 \pm 0,14$	$1,25 \pm 0,04^a$	$1,05 \pm 0,04^b$
Общие VFA	$88,14 \pm 3,13$	$79,3 \pm 3,28$	$29,26 \pm 0,62^a$	$26,46 \pm 0,82^b$
Лактат	$0,028 \pm 0,007$	$0,073 \pm 0,02$	$0,009 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,009$
Сукцинат	$0,29 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$

Кроме того, общая концентрация SCFA была выше у эффективных животных, демонстрирующих увеличение на 10% между двумя группами эффективности ($P < 0,01$; фигура 4A). Эти различия, как считается, оказывают заметное воздействие на эффективность животных, учитывая, что приблизительно 70% чистых потребностей в энергии животного удовлетворяются с помощью SCFA (Seymour *et al.*, 2005).

Интересно, что соотношение пропионата к ацетату у эффективных животных также являлось значимо более высоким, чем у неэффективных ($P < 0,05$; фиг. 4B); увеличение этого соотношения связано со снижением продукции метана и увеличением удержания энергии у крупного рогатого скота (Russell, 1998). Эти данные сопоставимы с измерениями потенциала метаногенеза микробиомов, при которых было очевидно, что микробиомы эффективных коров производят значительно меньше метана, чем их неэффективные аналоги ($P < 0,01$, фигура 3, конечные продукты метаболизма). Обнаружение более высоких концентраций SCFA и более низкого выделения метана из микробиомов рубца эффективных животных согласуется с представлением о том, что продукция пропионата и бутирата конкурирует с метаногенезом за водород и представляет собой альтернативный механизм, который служит в качестве акцептора электронов (Ungerfeld, 2015). Продукция большего количества SCFA и меньшего количества метана микробиомами эффективных коров согласуется с повышенной энергетической эффективностью.

Анализ не выявил каких-либо значимых различий в способности микробиомов разлагать клеточную стенку растений в рационе, *in vitro* или *in vivo* (фигура 3, полимеры и фигура 17A-D).

Дифференциальная относительная численность микроорганизмов и метаболических путей рубца

Более низкое разнообразие и более высокое доминирование в содержании генов и таксономическом составе, наблюдающиеся в микробиоме эффективных коров, вместе с изменениями в наборе метаболитов, указали на то, что поток через общие метаболические

пути различен в этой группе микробиомов. Это позволило выдвинуть гипотезу о том, что это может быть связано с изменениями в занятости конкретных микробиологических ниш рубца, определяемых метаболическими и физическими характеристиками, функциональными группами, которые различаются по их потребностям в ресурсах или продуктам на выходе.

Для исследования этой гипотезы провели перестановочный критерий суммы рангов Уилкоксона, в котором сравнивали генные и таксономические профили между микробиомами эффективных и неэффективных животных (Материалы и методы). В целом, 18 видов и 34166 генов дифференцировали микробиомы эффективных и неэффективных коров (фигуры 18 и 19); из них 2 вида и 227 генов характеризовались большей относительной численностью у эффективных коров. Эти виды и гены не только характеризовались дифференциально большей относительной численностью у коров с различными значениями RFI, но также значимо коррелировали с интенсивностью фенотипа (фигура 5A). Более низкие количества видов и генов, которые были более многочисленны в микробиомах эффективных коров, сопоставимы с более высоким доминированием и более низкой насыщенностью видов и состава генов этих микробиомов. Аннотации и анализ дифференцирующих генов по отношению к базе данных KEGG (Kanehisa *et al.*, 2011) также согласуются с этими результатами, а также с метаболомным анализом. Среди путей KEGG и полученных в результате метаболитов, которые находились в повышенных количествах в микробиомах неэффективных коров, находились ферменты из категории переваривания и абсорбции белка, категории биосинтеза аминокислот и метаболизма метана.

Кроме того, значительно меньшее число путей KEGG было увеличено в микробиомах эффективных коров, приводя к значительно меньшему числу потенциальных продуктов.

Эти данные свидетельствуют о том, что в микробиомах неэффективных коров существует более разнообразное использование соединений-ресурсов, таких как пищевые белки, пируват, ацетил-СоА и водород, что приводит в результате к более разнообразному набору производимых метаболитов, некоторые из которых влияют на аккумуляцию энергии животным в отрицательной форме или не могут быть использованы животным для удовлетворения его потребностей в энергии. В микробиомах эффективных коров использование этих соединений доминирует за счет ограниченного числа метаболических путей, которые являются более значимыми и ценными для энергетических потребностей животного.

В филогенетических аннотациях генов, которыми были обогащены микробиомы эффективных коров, преобладали виды бактерий рубца *Megasphaera elsdenii*, очень активный утилизатор лактата для производства бутирата и пропионата (фигура 5B). Эта аннотация или любая другая близкородственная аннотация не появилась в генах, которыми были обогащены микробиомы неэффективных коров. В целом, в микробиомах неэффективных коров были в меньшей степени преобладал конкретный таксон, уникальный для этой группы микробиомов (фигура 5B), что еще больше подтвердило гипотезу о более высоком доминировании конкретных функциональных групп в микробиомах эффективных коров. Это также подкреплялось аннотацией двух видов, которые являлись значимо более многочисленными в микробиомах эффективных коров в анализе генов 16S рРНК. Одна аннотация, которая появилась исключительно в этой группе, принадлежала к роду *Megasphaera*. Другие виды с повышенной относительной численностью принадлежали к семейству Lachnospiraceae, которое также имело представителя среди видов, которые были более многочисленны в микробиомах неэффективных коров (фигура 5A).

M. elsdenii также в высокой степени обогащал микробиомы эффективных коров, что установили с использованием другого геномного анализа, в котором прочтения из всех образцов выравнивали с базой данных из 59 секвенированных геномов микроорганизмов рубца и кишечника, которые, как известно, участвуют в различных метаболических процессах и были также идентифицированы в предыдущем анализе. И здесь снова неэффективные микробиомы являлись значимо более обогащенными несколькими микробиологическими геномами, среди которых *Methanobrevibacter ruminantium* ($P < 0,01$), метаногенная архея наиболее распространенного рода в рубце (фигура 6A и фигура 20). Это исследование дополнительно расширили, поставив вопрос, справедливы ли эти наблюдения не только для геномов конкретных микроорганизмов, но и для всех возможных ферментов KEGG, принадлежащих к метаболическим путям конечных продуктов рубца, с использованием одного и того же подхода на основании прочтения-выравнивания (Материалы и методы). В соответствии с предыдущими результатами путь метаногенеза являлся значительно обогащенным в микробиомах неэффективных коров ($P < 0,01$). Из всех исследованных путей продукции пропионата только акрилатный путь, который использует лактат для получения пропионата, являлся более представленным в микробиомах эффективных коров ($P < 0,01$; фигура 6B). Следует отметить, что этот путь кодируется в геноме *M. elsdenii* (Prabhu *et al.*, 2012) и *Coproccoccus catus* (Reichardt *et al.*, 2014), которыми, как обнаружили с помощью анализа, были значительно обогащены микробиомы эффективных животных (фигура 5, 6A, фигура 20), а не в геномах других исследуемых

микроорганизмов, использующих лактат (*S. ruminantium* и *A. lipolyticus*). Кроме того, прочтения, выровненные с этим путем, преимущественно аннотированы как *M. elsdenii* и *C. catus*, тем не менее, также обнаружены аннотации *Clostridium propionicum* и *Clostridium botulinum* (фигура 21). Это указывает на акрилатный путь как на основной фактор, способствующий увеличению пропионата и уменьшению лактата, что наблюдали в метаболомном анализе группы микробиома эффективных коров (фигура 3).

В таблице 4 представлен перечень бактерий, которые положительно коррелируют с высокой энергетической эффективностью, низкой продукцией метана, как видно из экспериментов, описанных в настоящем документе выше.

Таблица 4

	Последовательность_ID	SEQ ID NO:
(Clostridiales) под Megasphaera	denovo133121	4
семейство Lachnospiraceae	denovo613908	12
Prevotella bryantii B14		
Prevotella albensis DSM 11370 JCM 12258		
Ruminococcus flavefaciens ND2009		
Megasphaera elsdenii DSM 20460		
Megasphaera elsdenii		
Megasphaera elsdenii T81		
Streptococcus bovis ATCC 700338		
Coprococcus catus GD/7		
Methanobrevibacter smithii ATCC 35061		
Bacteroides sp. AR29		
Prevotella sp. AGR2160		
Allisonella histaminiformans DSM 15230		
Olsenella sp. KH2P3		
Bacteroides sp. AR20		
Prevotella sp. HUN102		
Olsenella umbonata DSM 22619		

В таблице 5 представлен перечень бактерий, которые положительно коррелируют с низкой энергетической эффективностью, высокой продукцией метана, как видно из экспериментов, описанных в настоящем документе выше

Таблица 5

	Последовательность_ID	SEQ ID NO:
семейство Lachnospiraceae	denovo167490	5
порядок Clostridiales	denovo108376	2
(Bacteroidales) под Prevotella	denovo255270	6
(Clostridiales) семейство Mogibacteriaceae	denovo540895	9

порядок Bacteroidales	denovo1028257	1
(Bacteroidales) под Prevotella	denovo428724	8
порядок Clostridiales	denovo110296	3
порядок Bacteroidales	denovo582030	11
порядок Bacteroidales	denovo747362	14
(Bacteroidales) под Prevotella	denovo976950	18
порядок Clostridiales	denovo963919	17
(Bacteroidales) семейство S24-7	denovo565357	10
(Bacteroidales) под CF231	denovo358968	7
порядок Clostridiales	denovo640035	13
порядок Clostridiales	denovo865633	16
(Clostridiales) семейство Ruminococcaceae	denovo855267	15
порядок Clostridiales	denovo980934	19
Prevotella ruminicola Ga6b6		
Prevotella ruminicola 23		
Prevotella brevis P6B11		
Prevotella brevis ATCC 19188		
Fibrobacter succinogenes S85		
Succinimonas amylolytica DSM 2873		
Ruminobacter sp. RM87		
Succinivibrio dextrinoslvens H5		
Ruminococcus flavefaciens FD-1		
Ruminococcus flavefaciens 17		
Ruminococcus albus 8		
Ruminococcus albus AD2013		
Ruminococcus albus 7		
Butyrivibrio fibrisolvens YRB2005		
Butyrivibrio fibrisolvens WTE3004		
Butyrivibrio fibrisolvens MD2001		
Butyrivibrio fibrisolvens FE2007		
Butyrivibrio fibrisolvens 164		
Bifidobacterium pseudolongum DSM 20092		
Bifidobacterium pseudolongum AGR2145		
Bifidobacterium pseudolongum PV8 2		
Bifidobacterium adolescentis 22L		
Bifidobacterium adolescentis L2 32		
Bifidobacterium thermophilum RBL67		
Bifidobacterium thermophilum DSM 20212		
Bifidobacterium thermophilum DSM 20210		
Anaerovibrio lipolyticus		
Anaerovibrio lipolyticus LB2005		
Selenomonas ruminantium ATCC 12561		
Selenomonas ruminantium AC2024		
Selenomonas ruminantium AB3002		
Streptococcus bovis B315		
Lachnospira multipara MC2003		

Lachnospira multipara LB2003		
Lachnospira multipara ATCC 19207		
Lactobacillus reuten штамм TMW1.112		
Lactobacillus reuten LTH5448		
Lactobacillus reuten LTH2584		
Pseudobutyrvibrio ruminis HUN009		
Pseudobutyrvibrio ruminis CF1b		
Pseudobutyrvibrio ruminis AD2017		
Lactobacillus plantarum штамм AG30		
Peptostreptococcus anaerobius 653 L		
Peptostreptococcus anaerobius VPI 4330 DSM 2949		
Clostridium aminophilum DSM 10710		
Clostridium sticklandii		
Methanobrevibacter ruminantium M1		
Methanomicrobium mobile BP T502		
Methanobacterium formicicum		
Methanosphaera stadtmanae DSM 3091		
Anaerovibrio sp. RM50		
Bacteroides sp. Ga6A1		
Bacteroides sp. Ga6A2		
Blautia schinkii DSM 10518		
Blautia sp. SF-50		
Blautia wexlerae AGR2146		
Butyrivibrio fibrisolvens AB2020		
Butyrivibrio fibrisolvens ND3005_2		
Butyrivibrio proteoclasticus FD2007		
Butyrivibrio proteoclasticus P6B7		
Butyrivibrio sp. AC2005		
Butyrivibrio sp. AD3002		
Butyrivibrio sp. AE2015_2		
Butyrivibrio sp. AE3004_2		
Butyrivibrio sp. AE3006_2		
Butyrivibrio sp. FC2001_2		
Butyrivibrio sp. IN11a14		
Butyrivibrio sp. IN11a16		
Butyrivibrio sp. IN11a18		
Butyrivibrio sp. LC3010		
Butyrivibrio sp. MB2005		
Butyrivibrio sp. MC2021_2		
Butyrivibrio sp. NC2002		
Butyrivibrio sp. NC2007		
Butyrivibrio sp. OB235		
Butyrivibrio sp. Su6		
Butyrivibrio sp. TB		
Butyrivibrio sp. VCB2001		
Butyrivibrio sp. VCB2006		

Butyrivibrio sp. WCD2001_2		
Butyrivibrio sp. WCE2006		
Butyrivibrio sp. XBB1001_2		
Butyrivibrio sp. XPD2002_2		
Butyrivibrio sp. XPD2006_2		
Butyrivibrio sp. YAB3001		
Clostridium aminophilum F		
Clostridiales bacterium NK3B98		
Clostridiales bacterium WTE2008		
Clostridium polysaccharolyticum DSM1801		
Enterobacter sp. KPR-6		
Erysipelotrichaceae bacterium NK3D112		
Eubacterium ruminatum HUN269		
Lachnospiraceae bacterium AC2014_2		
Lachnospiraceae bacterium AC2028_2		
Lachnospiraceae bacterium AC2029_2		
Lachnospiraceae bacterium AD3010		
Lachnospiraceae bacterium C6A11		
Lachnospiraceae bacterium G41		
Lachnospiraceae bacterium KH1P17		
Lachnospiraceae bacterium MA2020_2		
Lachnospiraceae bacterium MC2017_2		
Lachnospiraceae bacterium MD2004		
Lachnospiraceae bacterium NK4A144		
Lachnospiraceae bacterium P6A3		
Lachnospiraceae bacterium XBB2008		
Lachnospiraceae bacterium XBD2001		
Methanobrevibacter olleyae DSM 16632		
Oribacterium sp. FC2011		
Oribacterium sp. P6A1		
Prevotella sp. FD3004		
Prevotella sp. KHP7		
Propionibacterium sp. MB3007		
Pseudobutyrvibrio sp. ACV-2		
Pseudobutyrvibrio sp. MD2005		
Pseudobutyrvibrio sp. OR37		
Pseudobutyrvibrio sp. UC1225		
Pseudobutyrvibrio xylanivorans DSM 10317		
Ruminococcaceae bacterium AE2021		
Ruminococcaceae bacterium D5		
Ruminococcaceae bacterium KHP2		
Ruminococcus sp. NK3A76		
Ruminococcus sp. YE71		
Sarcina sp. DSM 11001		
Streptococcus bovis 2B		
Streptococcus bovis AG46_2		

Streptococcus bovis SN033		
Streptococcus equinus GA-1		
Streptococcus equinus pGA-7		
Streptococcus equinus pR5		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ многочисленных животных, питающихся одинаковым рационом и содержащихся при одинаковых условиях, показал, что существуют большие различия в способности отдельных животных извлекать энергию из своего корма. Эти различия тесно связаны с несколькими признаками микробиомов, которые включают в себя снижение насыщенности и увеличение доминирования таксономической и кодирующей способности в микробиоме эффективной коровы. Они находят отражения в изменениях в функциональности этой экосистемы, где изменения в доминировании конкретных функциональных компонентов влияют на общую доступность продуктов экосистемы, которые имеют высокую ценность для животного-хозяина. Недавно было описано, что повышенная насыщенность микробиома и изменения в конкретных функциональных группах влияют на производительность хозяев у растений (Wagg *et al.*, 2014), а также у людей, где пониженное разнообразие и насыщенность связаны с более высокой энергией, аккумулируемой из пищи у людей с ожирением (Turnbaugh *et al.*, 2009, Le Chatelier *et al.*, 2013). Возможное объяснение этого явления может быть обусловлено более разнообразным использованием соединений-ресурсов в микробиомах неэффективной коровы, которые обогащены видами, генами и путями KEGG, что приводит к более широкому спектру выходящих метаболитов (фигуры 3, 6 и 7); это также нашло подтверждение в значительно повышенных выходящих метаболитах KEGG. С другой стороны, в микробиоме эффективной коровы более простые сети метаболических путей приводят к повышенному доминированию конкретных функциональных компонентов, что приводит к повышенным концентрациям продуктов экосистемы, которые являются значимыми для хозяина (фигура 7B). Следовательно, эффективные микробиомы менее сложны, но более специализированы для поддержки энергетических потребностей хозяина.

Это понятие проиллюстрировано обнаружением повышенных концентраций SCFA, которые являются ценными для животного-хозяина, SCFA поглощаются через стенку рубца для удовлетворения энергетических потребностей животных; пропионат, например, является основным предшественником глюконеогенеза у животных (Russell & Wilson, 1996, Mizrahi, 2011, Mizrahi, 2013). Это не относится к метану, так как сохраняемая в нем энергия не может поглощаться животными и теряется в атмосфере. Такие метаболические изменения, как правило, достигаются путем использования антибиотиков - стимуляторов

роста, которые повышают эффективность использования кормов животного (Duffield *et al.*, 2012). Так обстоит дело с монензином, карбоксильным полиэфирным ионофором, который селективно влияет на некоторые из микроорганизмов рубца, следовательно, изменяя структуру микробиома рубца и впоследствии соотношение SCFA в рубце, увеличивая пропионовую кислоту и уменьшающую продукцию метана (Thornton & Owens, 1981, Callaway *et al.*, 2003, Weimer *et al.*, 2008, Duffield *et al.*, 2012). Было показано, что при пероральном введении монензин улучшает эффективность использования кормов у крупного рогатого скота дозозависимым образом. В связи с этим, его широко использовали для этой цели с того момента, как его одобрили для применения в животноводстве крупного рогатого скота в середине 1970-х годов (Duffield *et al.*, 2012). Этот эффект управления микробиомом рубца, достигнутый посредством антибиотиков, дополнительно указывает на связь микробиома рубца с эффективностью использования кормов животного.

В настоящем документе авторы настоящего изобретения показывают, что эти метаболомные изменения являются результатом структур микробиомов, которые встречаются в природе и в высокой степени коррелируют с фенотипом эффективности использования кормов и прогнозируют его. Таким образом, эти результаты можно использовать для сокращения применения антибиотиков - стимуляторов роста в сельском хозяйстве.

С экологической точки зрения пониженная относительная численность путей метаногенеза и метаногенных архей в микробиоме эффективной коровы с низкой насыщенностью согласуется с представлением о том, что процессы, выполняемые небольшими таксономическими группами, такими как метаногенные археи, которые занимают лишь небольшие проценты микробиома рубца, более чувствительны к изменениям в разнообразии и насыщенности (Hooper *et al.*, 1995). Эти изменения обычно сопровождаются заполнением и доминированием доступной ниши различными видами с использованием одних и тех же ресурсов (Grime, 1998). Так обстоит дело с *M. elsdenii* и *C. catus*, которыми, как независимо обнаружили, обогащены микробиомы эффективных животных в различных анализах (фигуры 5, 6A и 20), которые используют электроны для продукции ценных SCFA: пропионатов и бутирата, тем самым отвлекая их от восстановления CO₂ до метана (Prabhu *et al.*, 2012, Ungerfeld, 2015). Аналогичный принцип, как было показано, применяли у кенгуру Дерби, когда предложили использовать бактерии *Succinivibrio* для использования водорода для продукции сукцината, следовательно, снижая его доступность для метаногенеза (Pope *et al.*, 2011). Возможно также, что обнаруженные Lachnospiraceae в микробиомах эффективных животных, являются производителями бутирата (фигура 5) и вносят дополнительный вклад в этот эффект (Louis & Flint, 2009,

Meehan & Beiko, 2014). Тем не менее, по мере того как другие SCFA обогащают микробиомы этой группы, и большая часть углеродного потока в системе идет в ацетил CoA, формиат или водород и углекислый газ, вероятно, что в этот эффект вовлечены больше генов и путей.

5 Кардинальная точка, которая вытекает из этих результатов, состоит в том, что функциональные характеристики небольшого числа видов могут существенно влиять на структуру сообщества и функционирование экосистемы. Это, в свою очередь, может изменить производительность сверхорганизма - хозяина и локализованного в его рубце микробиома.

10 Эти выводы потенциально можно использовать для увеличения продукции продовольственных ресурсов для человечества более рационально с экологической точки зрения, а также для понимания лежащих в основе экологических механизмов, которые управляют сложными микробиологическими сообществами и их взаимодействия с их хозяевами.

15 Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в сочетании с конкретными вариантами его осуществления, очевидно, что многие альтернативы, модификации и вариации будут очевидны специалистам в настоящей области техники. Соответственно, предполагается охватить все такие альтернативы, модификации и вариации, которые подпадают под сущность и широкий объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на выдачу патентов, упомянутые в
20 настоящем описании изобретения, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки, в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на выдачу патента были конкретно и индивидуально включены в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, цитирование или
25 идентификация любой ссылки в настоящей заявке не следует толковать как допущение того, что такая ссылка доступна в качестве предшествующего уровня техники для настоящего изобретения.

Ссылки

Aha DW. (1997). *Lazy learning*. Springer Science & Business Media.

Ajmone-Marsan P, Garcia JF, Lenstra JA. (2010). On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. *Evol Anthropol Issues News Rev*, 19, 148-157.

5 Archer JA, Richardson EC, Herd RM, Arthur PF. (1999). Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle. *Aust J Agric Res* 50, 147-162.

Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B (Methodological)*, 289-300.

10 Bradford GE. (1999). Contributions of animal agriculture to meeting global human food demand. *Livest Prod Sci*, 59, 95-112.

Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller ME, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, *et al.* (2009). Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 1948-53.

15 Callaway TR, Edrington TS, Rychlik JL, Genovese KJ, Poole TL, Jung YS, *et al.* (2003). Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr Issues Intest Microbiol*, 4, 43-51.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7, 335-336.

20 Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, *et al.* (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*, 31, 442-443.

25 Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674-3676.

Gene Ontology Consortium. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*, 32, D258-D261.

Davis JC. (1986). *Statistics and data analysis in geology*. Wiley.

30 Duffield TF, Merrill JK, Bagg RN. (2012). Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *J Anim Sci*, 90, 4583-92.

Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*, 11, 2112-2122.

Edgar RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460-2461.

Grime J. (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *J Ecol*, 86, 902-910.

Halachmi I, Edan Y, Maltz E, Peiper U, Moallem U, Brukental I. (1998). A real-time control system for individual dairy cow food intake. *Comput Electron Agr*, 20, 131-144.

5 Harper D. (1999). Numerical palaeobiology. Wiley.

Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Collaborators GRC, et al. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*, 5.

10 Herd RM, Arthur PF. (2009). Physiological basis for residual feed intake. *J Anim Sci*, 87, E64-E71.

Hernandez-Sanabria E, Goonewardene LA, Wang Z, Durunna ON, Moore SS. (2012). Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. *Appl Environ Microb*, 78, 1203-1214.

15 Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim TW, Chokhawala H, Schroth G, et al. (2011). Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*, 331, 463-467.

Holdman LV, Moore WEC. (1974). New genus, *Coprococcus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces. *Int J Syst Evol Micr*, 24, 260-277.

20 Hooper DU, Hawksworth D, Dhillon S. (1995). Microbial diversity and ecosystem processes. Global biodiversity assessment. UNEP. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 433-443.

25 Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, *et al.* (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr*, 75, 3-35.

Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J*, 7, 1069-1079.

Jami E, Mizrahi I. (2012). Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS ONE*, 7, e33306.

30 Jami E, White BA, Mizrahi I. (2014). Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS ONE*, 9, e85423.

35 Pollard KS, Dudoit S, van der Laan MJ. (2005). Multiple Testing Procedures: the multtest Package and Applications to Genomics. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S (eds). *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. Springer New York, pp 249-271

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. (2011). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*, gkr988.

Kittelmann S, Pinares-Patiño CS, Seedorf H, Kirk MR, Ganesh S, Mcewan JC, et al. (2014). Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. *PLoS One*, 9, e103171.

Koch RM, Swiger LA, Chambers D, Gregory KE. (1963). Efficiency of feed use in beef cattle. *J Anim Sci*, 22, 486- 494.

Kultima JR, Sunagawa S, Li J, Chen W, Chen H, Mende DR, et al. (2012). MOCAT: a metagenomics assembly and gene prediction toolkit. *PLoS One*, 7, e47656.

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, *et al.* (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500, 541-546.

Li D, Lewinger JP, Gauderman WJ, Murcray CE, Conti D. (2011). Using extreme phenotype sampling to identify the rare causal variants of quantitative traits in association studies. *Genet Epidemiol*, 35, 790-9.

Li H, Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-1760.

Lippke H, Ellis WC, Jacobs BF. (1986). Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. *J Dairy Sci*, 69, 403-412.

Louis P, Flint HJ. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*, 294, 1-8.

McDougall E. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J*, 43, 99.

McMichael AJ, Powles JW, Butler CD, Uauy R. (2007). Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet*, 370, 1253-1263.

Meehan CJ, Beiko RG. (2014). A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. *Genome Biol Evol*, 6, 703-713.

Meyer F, Paarmann D, D'souza M, Olson R, Glass E, Kubal M, *et al.* (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9, 386.

Mizrahi I. (2011). The Role of the Rumen Microbiota in Determining the Feed Efficiency of Dairy Cows. In: Rosenberg E, Gophna U (eds). *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*. Springer Science & Business Media, pp 203-210.

Mizrahi I. (2013). Rumen symbioses. In: Rosenberg E, DeLong F, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds). *The Prokaryotes*. Springer Science & Business Media, pp 533-544.

Moore SS, Mujibi FD, Sherman EL. (2009). Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. *J Anim Sci*, 87, E41-7.

Nkrumah JD, Okine EK, Mathison GW, Schmid K, Li C, Basarab JA, *et al.* (2006). Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J Anim Sci*, 84, 145-53.

Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, *et al.* (2009). The NIH human microbiome project. *Genome Res*, 19, 2317-2323.

Pope PB, Smith W, Denman SE, Tringe SG, Barry K, Hugenholtz P, *et al.* (2011). Isolation of *Succinivibrionaceae* implicated in low methane emissions from Tammar wallabies. *Science*, 333, 646-8.

Prabhu R, Altman E, Eiteman MA. (2012). Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Appl Environ Microbiol*, 78, 8564-70.

Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res*, 35, D61-D65.

Pryce J, Arias J, Bowman P, Davis S, Macdonald K, Waghorn G, *et al.* (2012). Accuracy of genomic predictions of residual feed intake and 250-day body weight in growing heifers using 625,000 single nucleotide polymorphism markers. *J Dairy Sci*, 95, 2108-2119.

Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, *et al.* (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J*, 8, 1323-35.

Rho M, Tang H, Ye Y. (2010). FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Res*.

Russell JB. (1998). The Importance of pH in the Regulation of Ruminal Acetate to Propionate Ratio and Methane Production In Vitro. *J Dairy Sci*, 81, 3222-3230.

Russell JB, Rychlik JL. (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292, 1119-1122.

Russell JB, Wilson DB. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J Dairy Sci*, 79, 1503-1509.

Saleem F, Bouatra S, Guo AC, Psychogios N, Mandal R, Dunn SM, *et al.* (2013). The bovine ruminal fluid metabolome. *Metabolomics*, 9, 360-378.

Seymour WM, Campbell DR, Johnson ZB. (2005). Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. *Anim Feed Sci Tech*, 119, 155-169.

Shi W, Moon CD, Leahy SC, Kang D, Froula J, Kittelmann S, et al. (2014). Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Res*, 24, 1517-1525.

Stevenson DM, Weimer PJ. (2007). Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 165-74.

Thornton JH, Owens FN. (1981). Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. *J Anim Sci*, 52, 628-34.

Thornton PK. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365, 2853-67.

Tilley J, Terry R. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci*, 18, 104-111.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, *et al.* (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.

Ungerfeld EM. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Front Microbiol*, 6, 37.

van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74, 3583-97.

Wagg C, Bender SF, Widmer F, van der Heijden MG. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 5266-70.

Wallace RJ, Rooke JA, Mckain N, Duthie CA, Hyslop JJ, Ross DW, et al. (2015). The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics*, 16, 1.

Weimer PJ, Stevenson DM, Mertens DR, Thomas EE. (2008). Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 135-45.

Westfall PH, Young SS. (1993). Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment, John Wiley & Sons.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение средства для получения лекарственного препарата для увеличения эффективности использования кормов или уменьшения продукции метана у жвачного животного, причем средство:

- (i) представляет собой вид бактерий, представленный в таблице 4;
- (ii) представляет собой род бактерий *Megasphaera*; и/или
- (iii) специфически понижает количество бактерии, представленной в таблице 5.

2. Применение по п. 1, при котором указанный корм представляет собой силос.

3. Применение по п. 1, при котором указанное средство, которое специфически понижает количество бактерии, представленной в таблице 5, представляет собой антибактериальный пептид или бактериофаг.

4. Применение по п. 1, при котором указанное средство, которое специфически понижает количество бактерии, представленной в таблице 5, не является антибиотиком.

5. Применение по любому из пп. 1-4, при котором возраст жвачного животного меньше 6 месяцев.

6. Применение по любому из пп. 1-5, при котором указанная композиция входит в состав корма.

7. Применение по любому из пп. 1-5, при котором указанная композиция входит в состав силоса.

8. Применение по любому из пп. 1-5, при котором указанная композиция входит в состав клизмы.

9. Применение по любому из пп. 1-8, при котором указанное жвачное животное было подвергнуто предварительному лечению с помощью антибиотика.

10. Применение по любому из пп. 1-9, при котором указанное жвачное животное представляет собой корову.

11. Микробиологическая композиция, содержащая 2-100 видов бактерий, причем по меньшей мере один из видов является таким, как представлено в таблице 4.

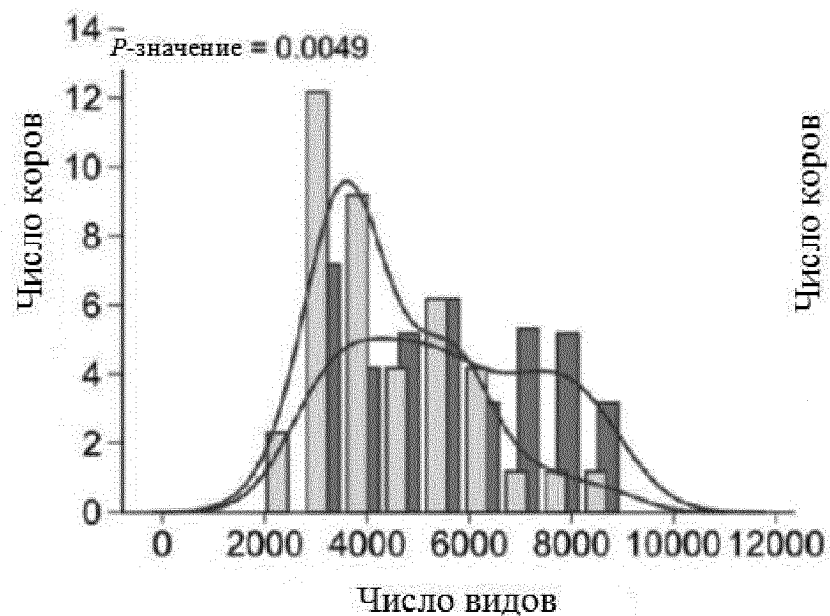
12. Микробиологическая композиция по п. 11, не содержащая фекальный материал.

13. Микробиологическая композиция по п. 11, составленная в виде корма, силоса или клизмы.

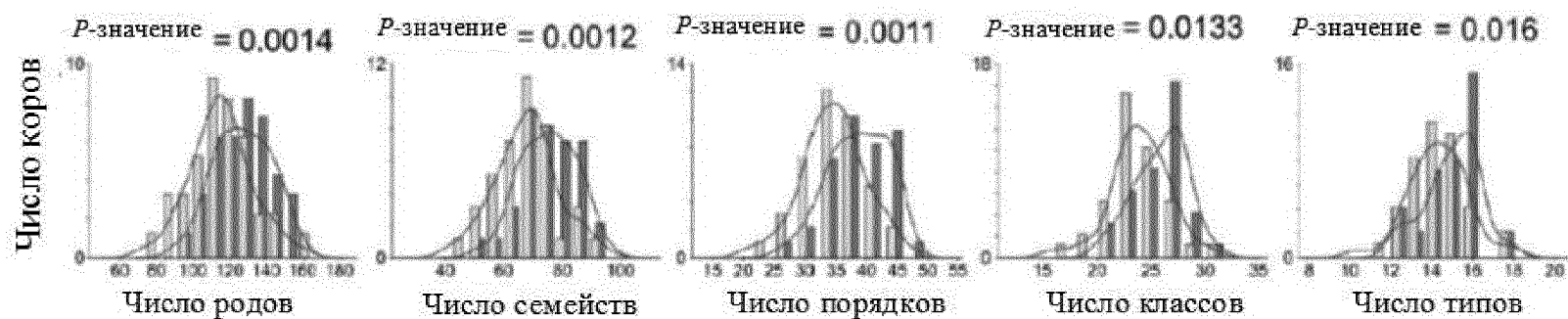
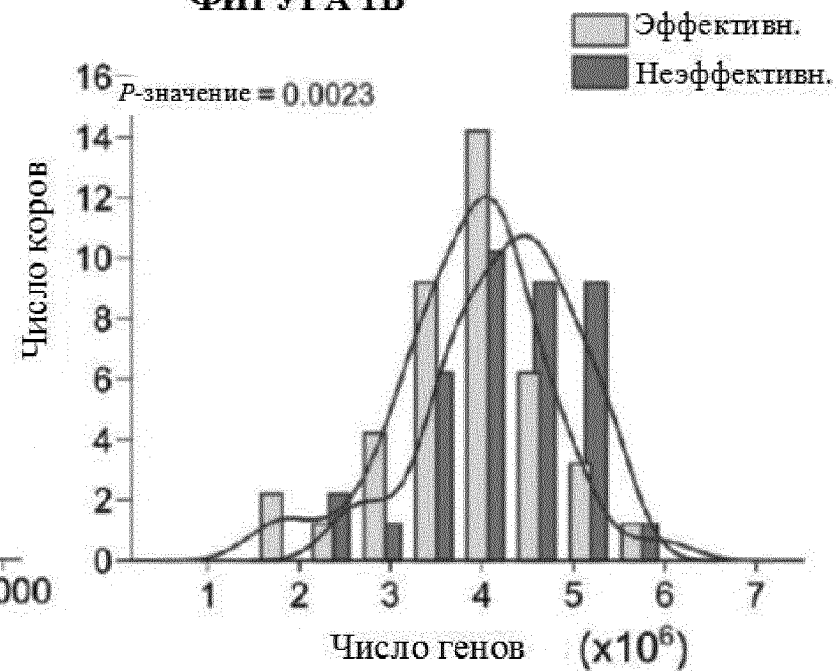
14. Антибактериальная композиция, содержащая по меньшей мере одно средство, которое специфически понижающе регулирует по меньшей мере один вид бактерий, который представлен в таблице 5.

15. Антибактериальная композиция по п. 14, составленная в виде корма, силоса или клизмы.

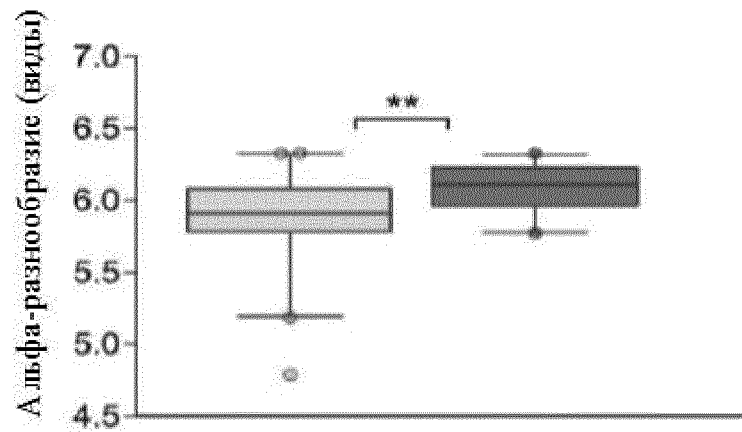
ФИГУРА 1А



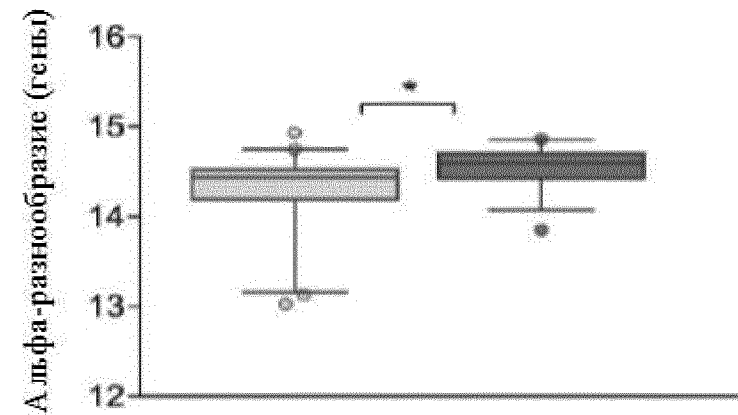
ФИГУРА 1В



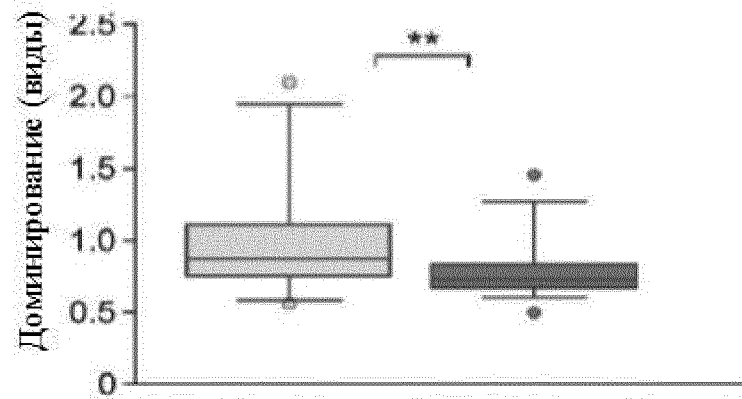
ФИГУРА 1С



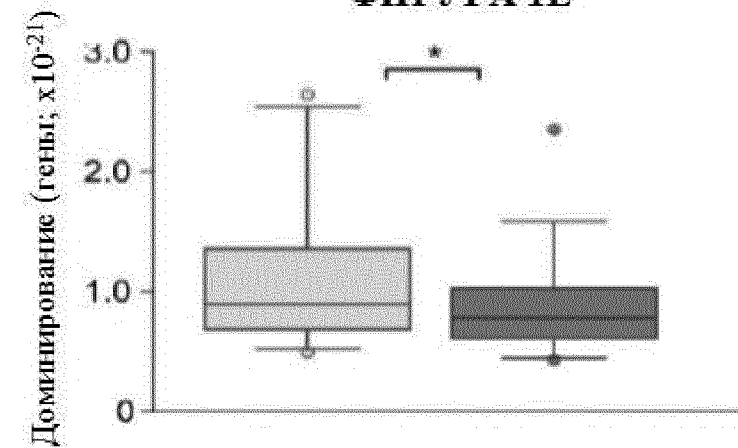
ФИГУРА 1D



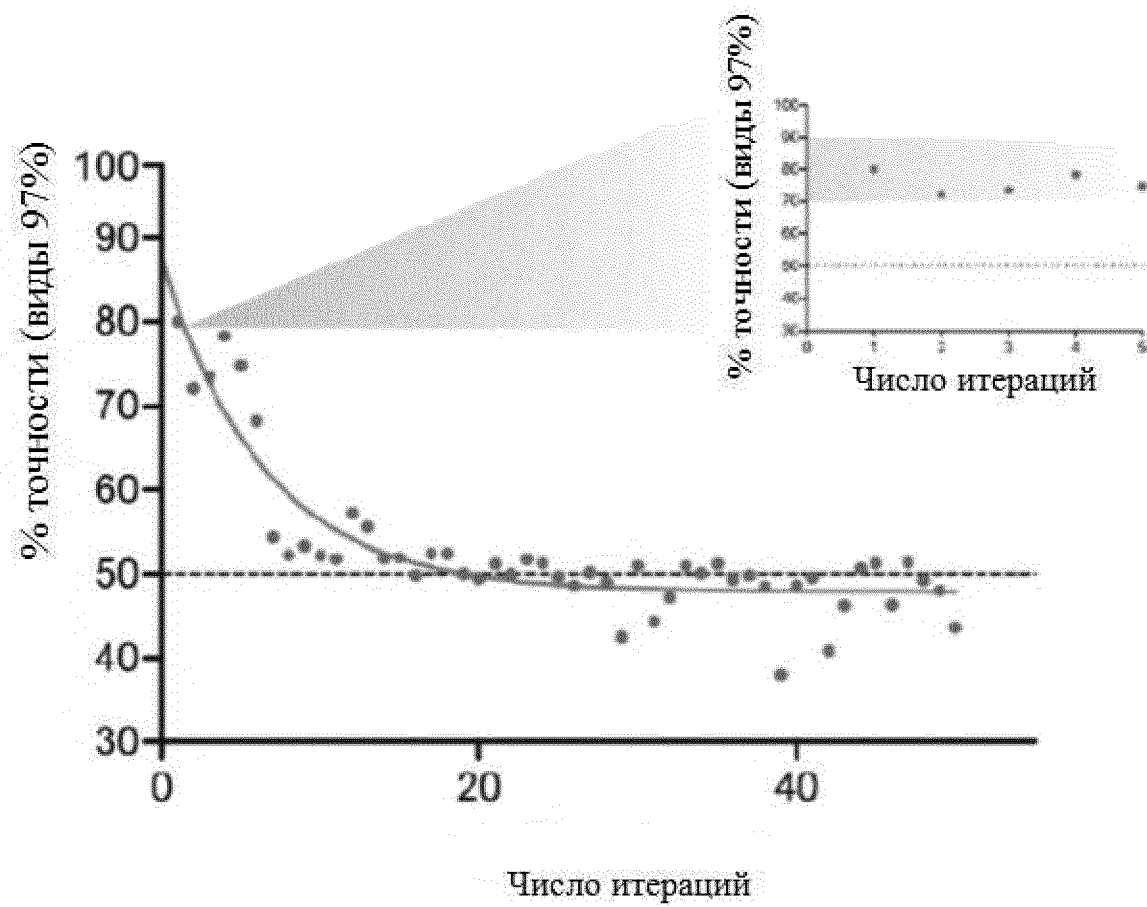
ФИГУРА 1E



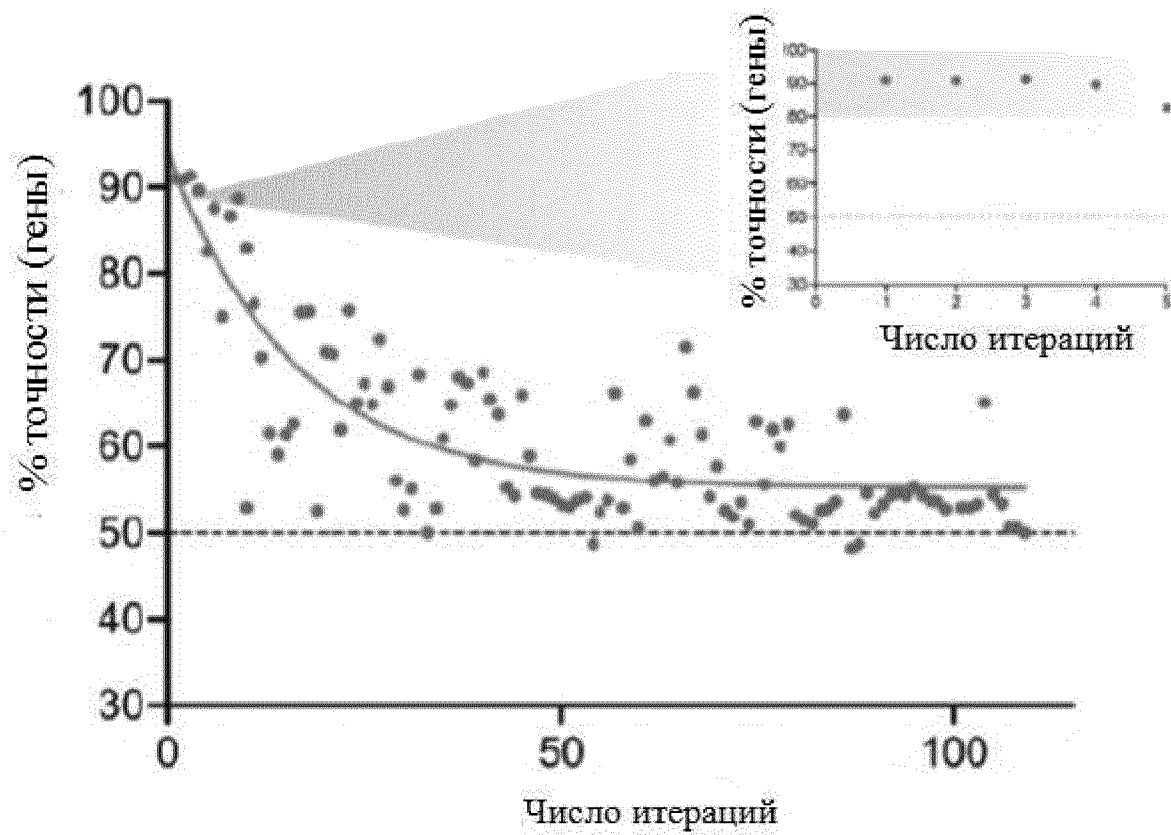
ФИГУРА 1F



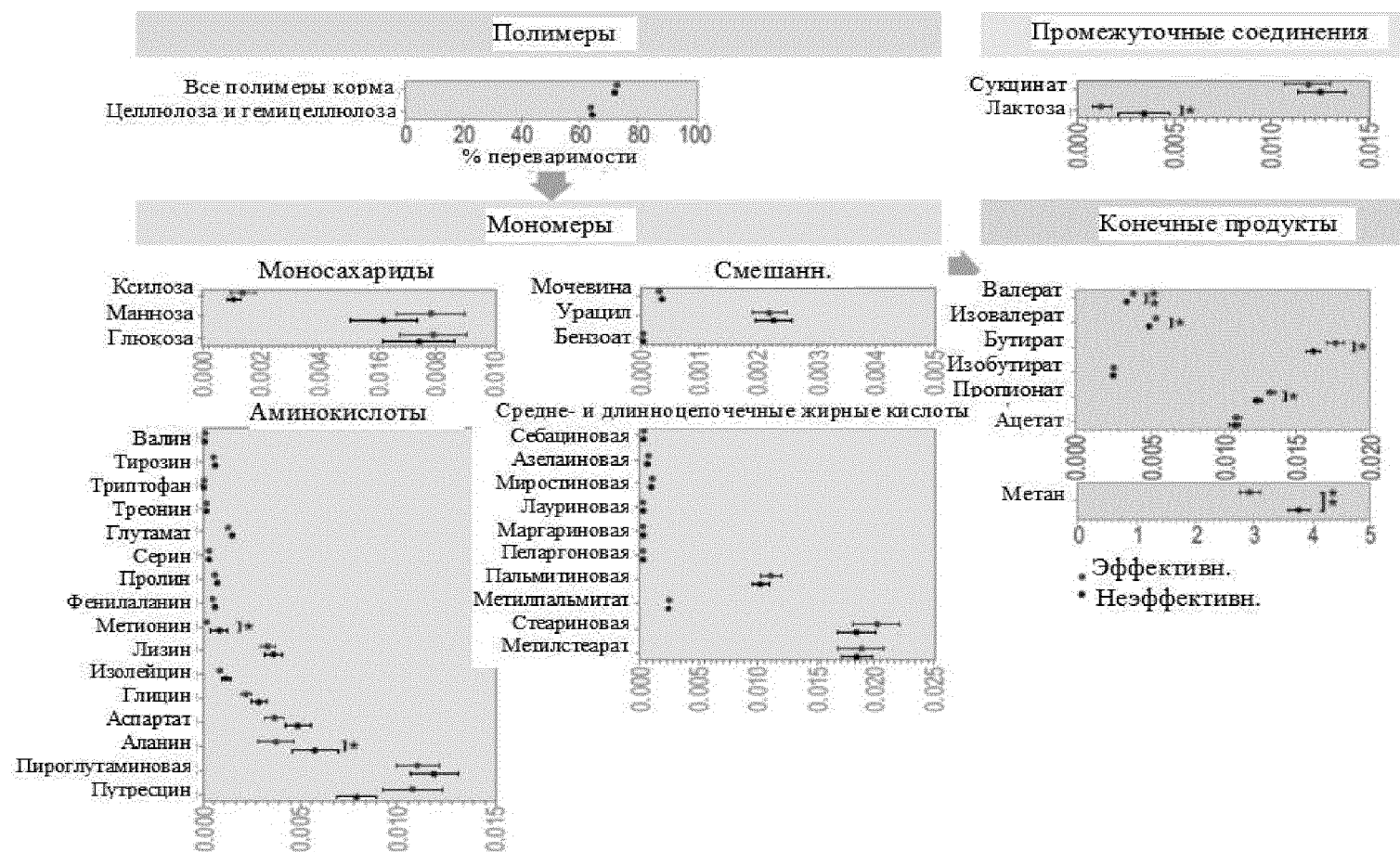
ФИГУРА 1G



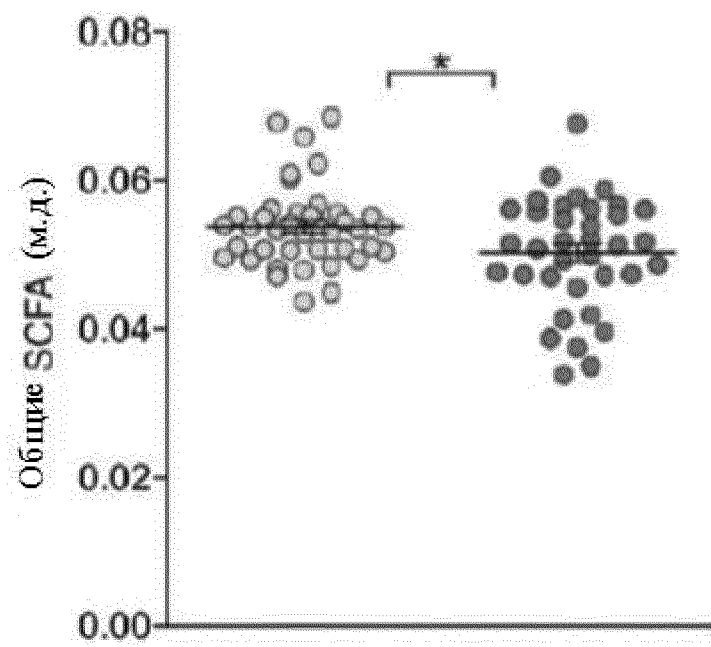
ФИГУРА 2А



ФИГУРА 2В

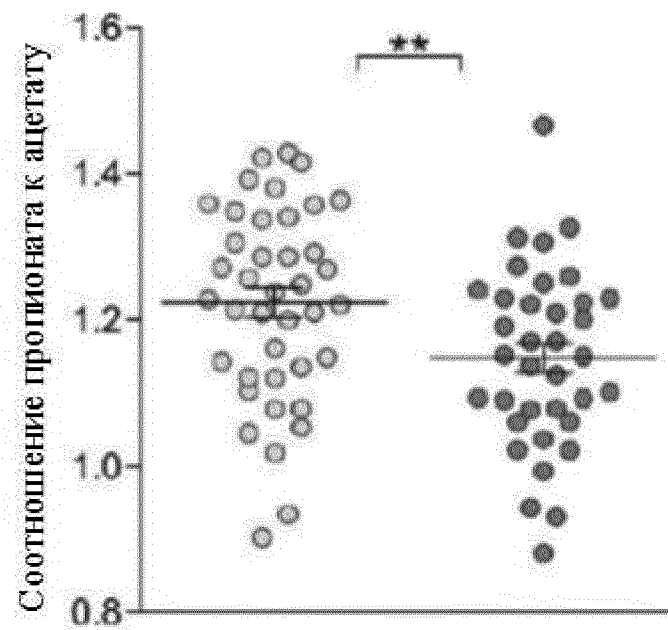


ФИГУРА 3

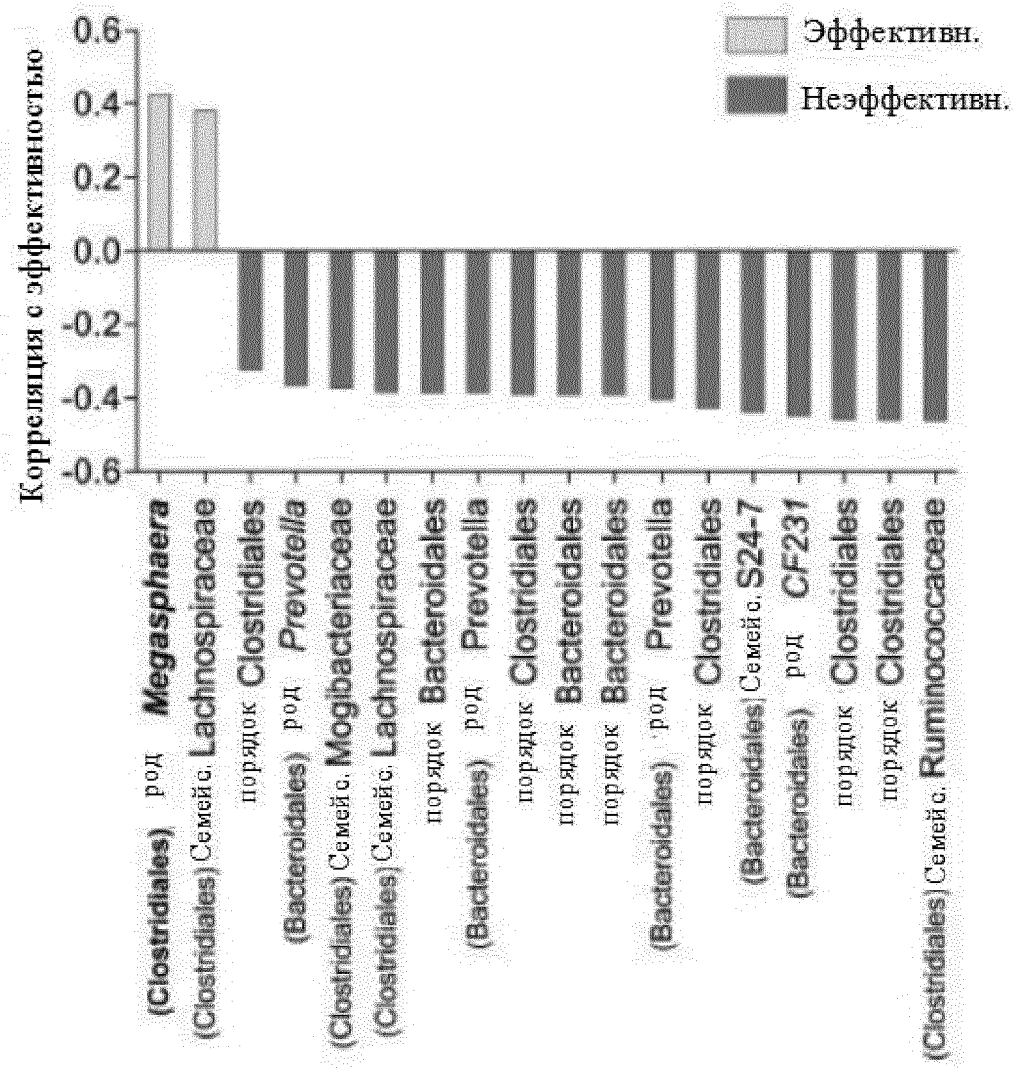


○ Эффективн.
● Неэффективн.

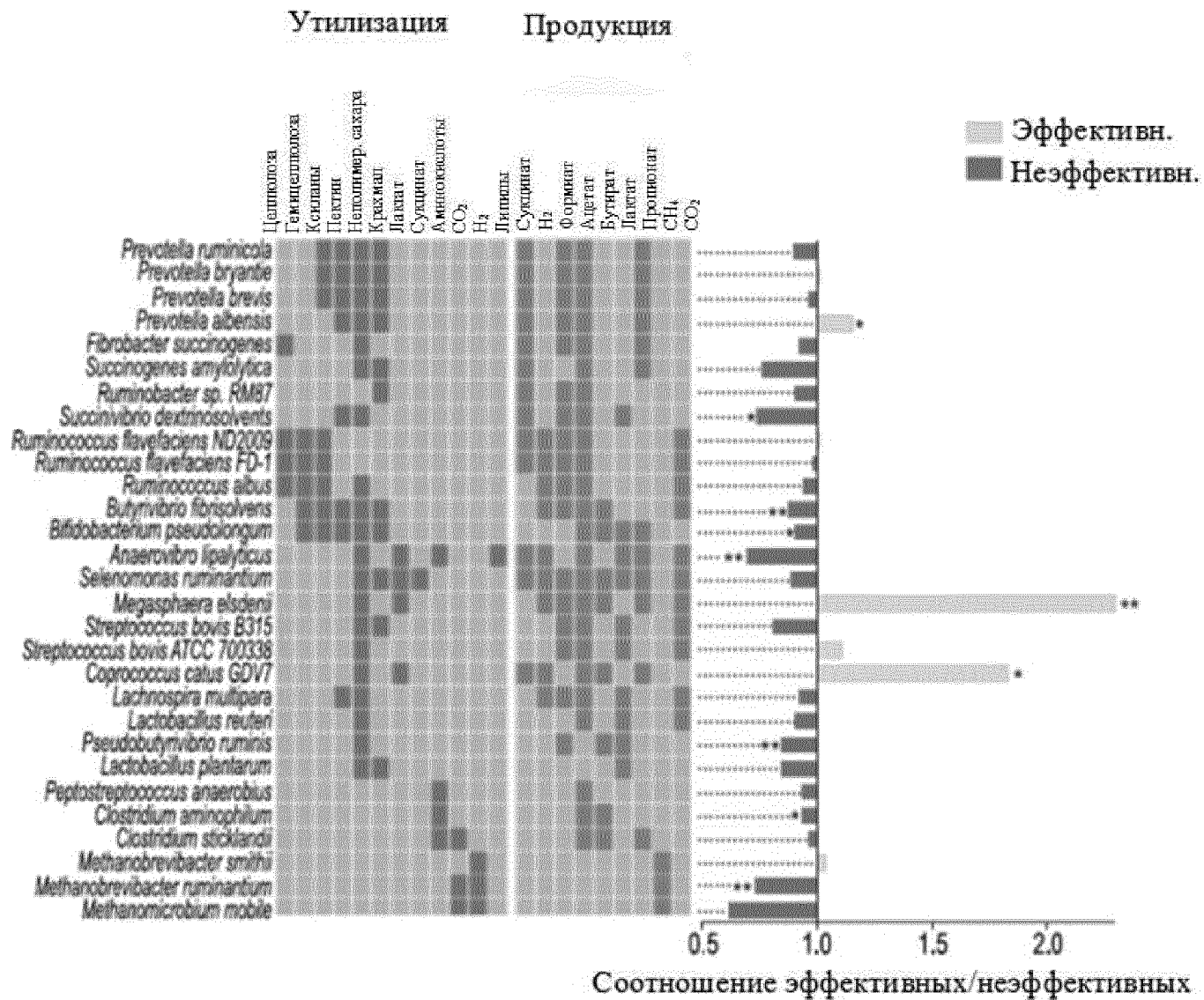
ФИГУРА 4А



ФИГУРА 4В



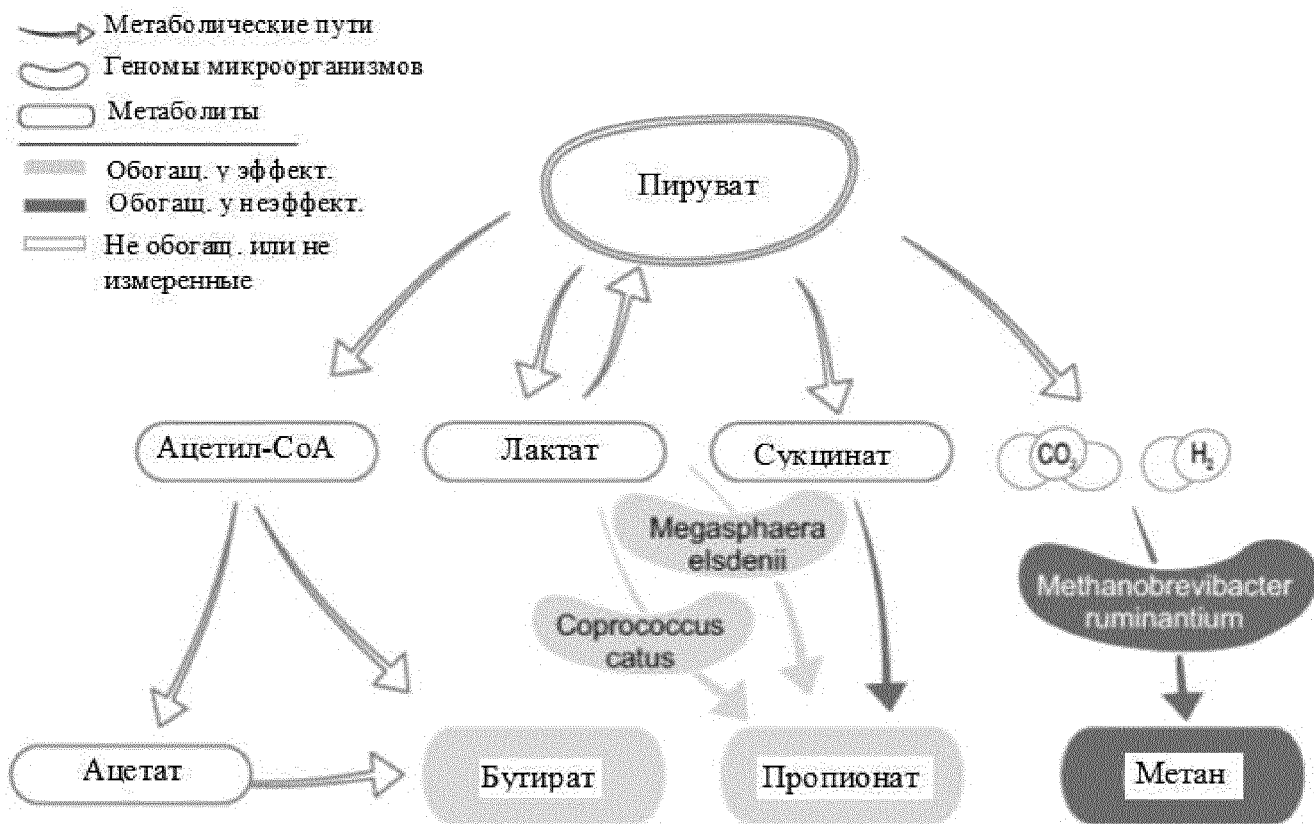
ФИГУРА 5А



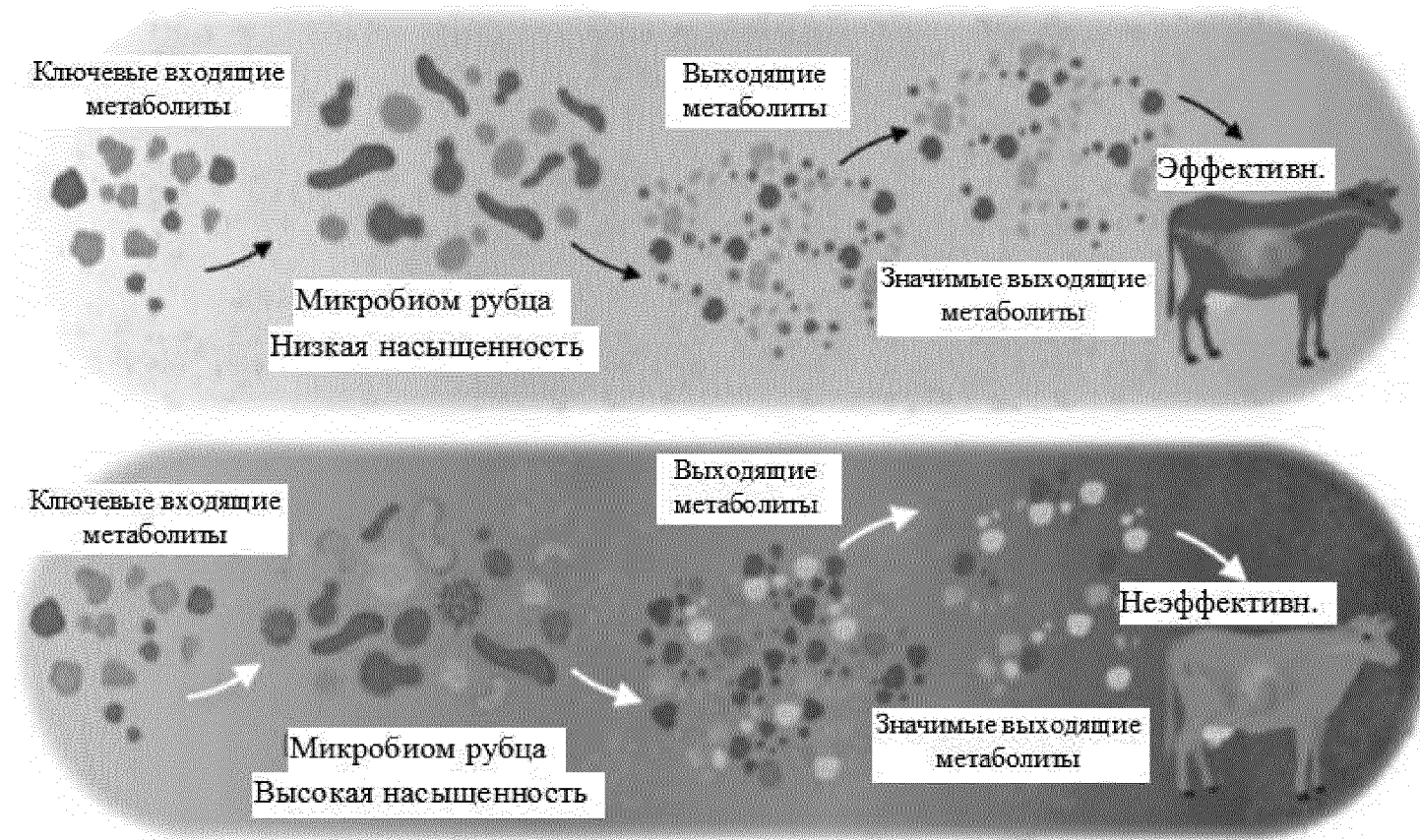
ФИГУРА 6А



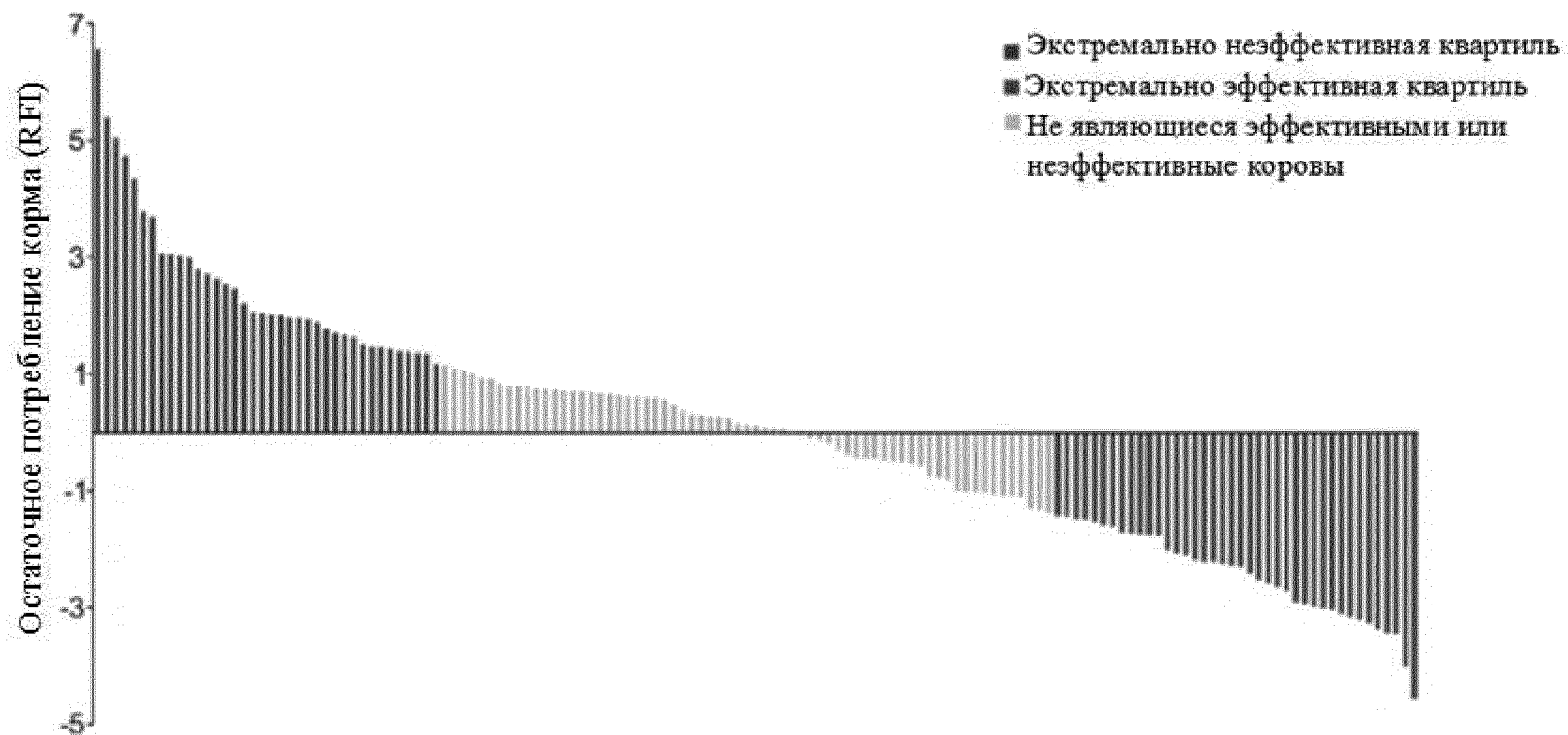
ФИГУРА 6В



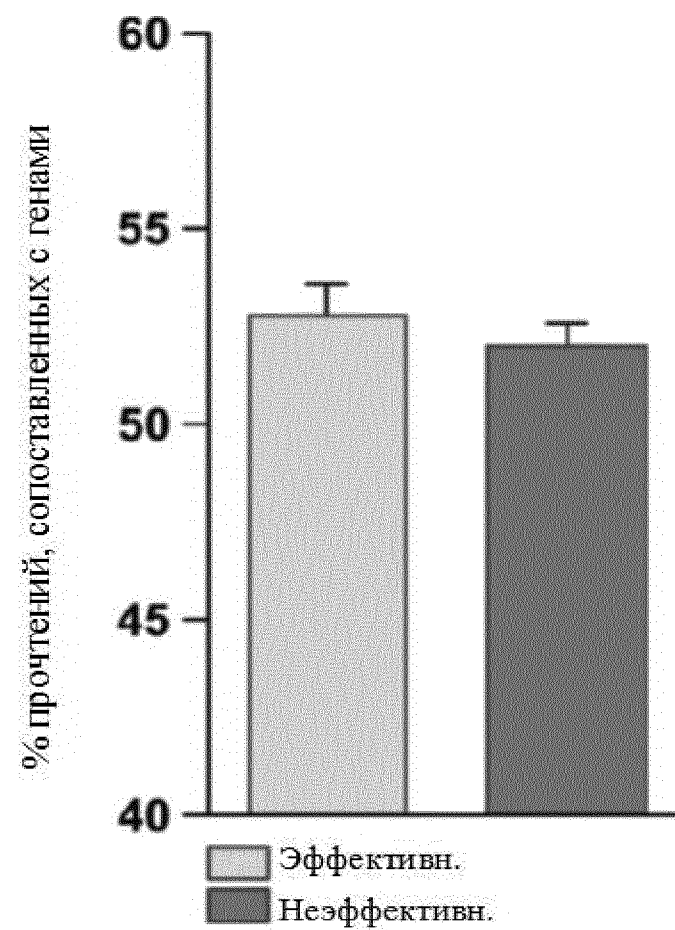
ФИГУРА 7А



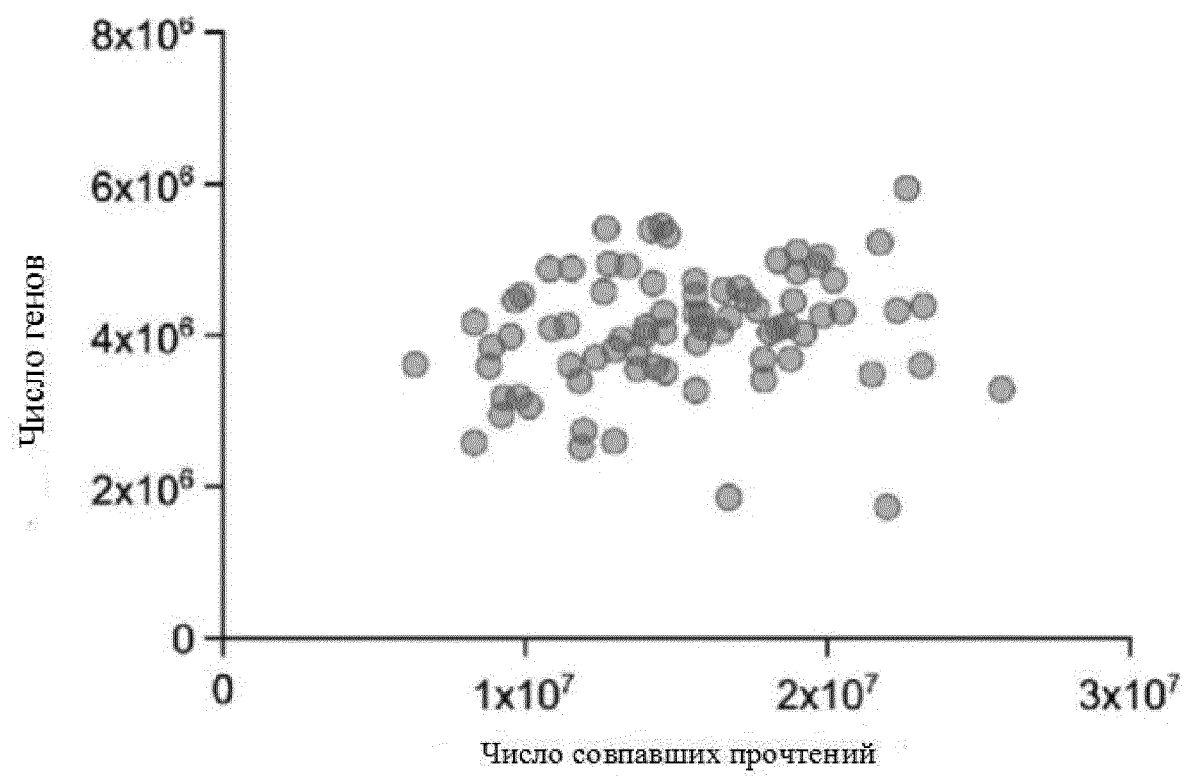
ФИГУРА 7В



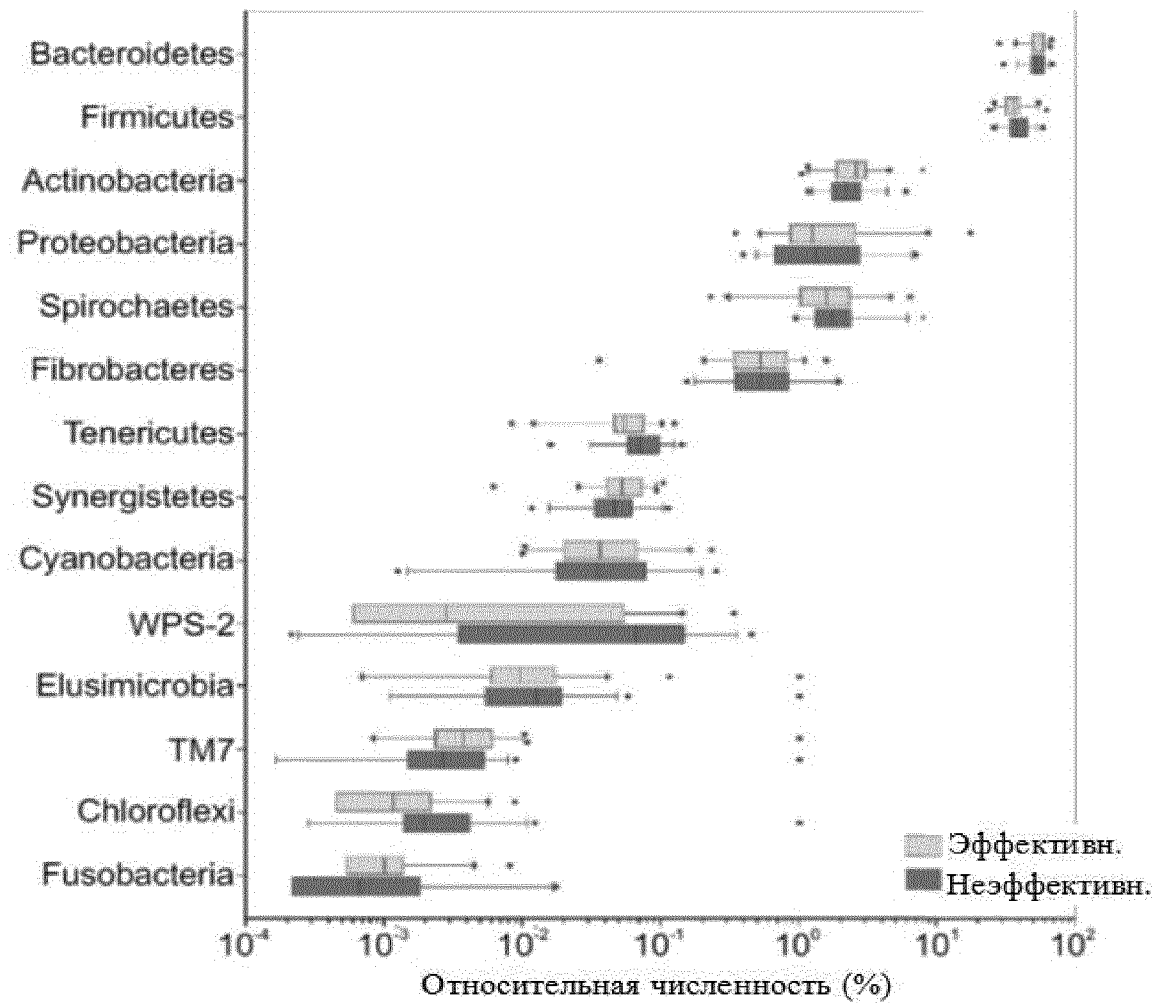
ФИГУРА 8



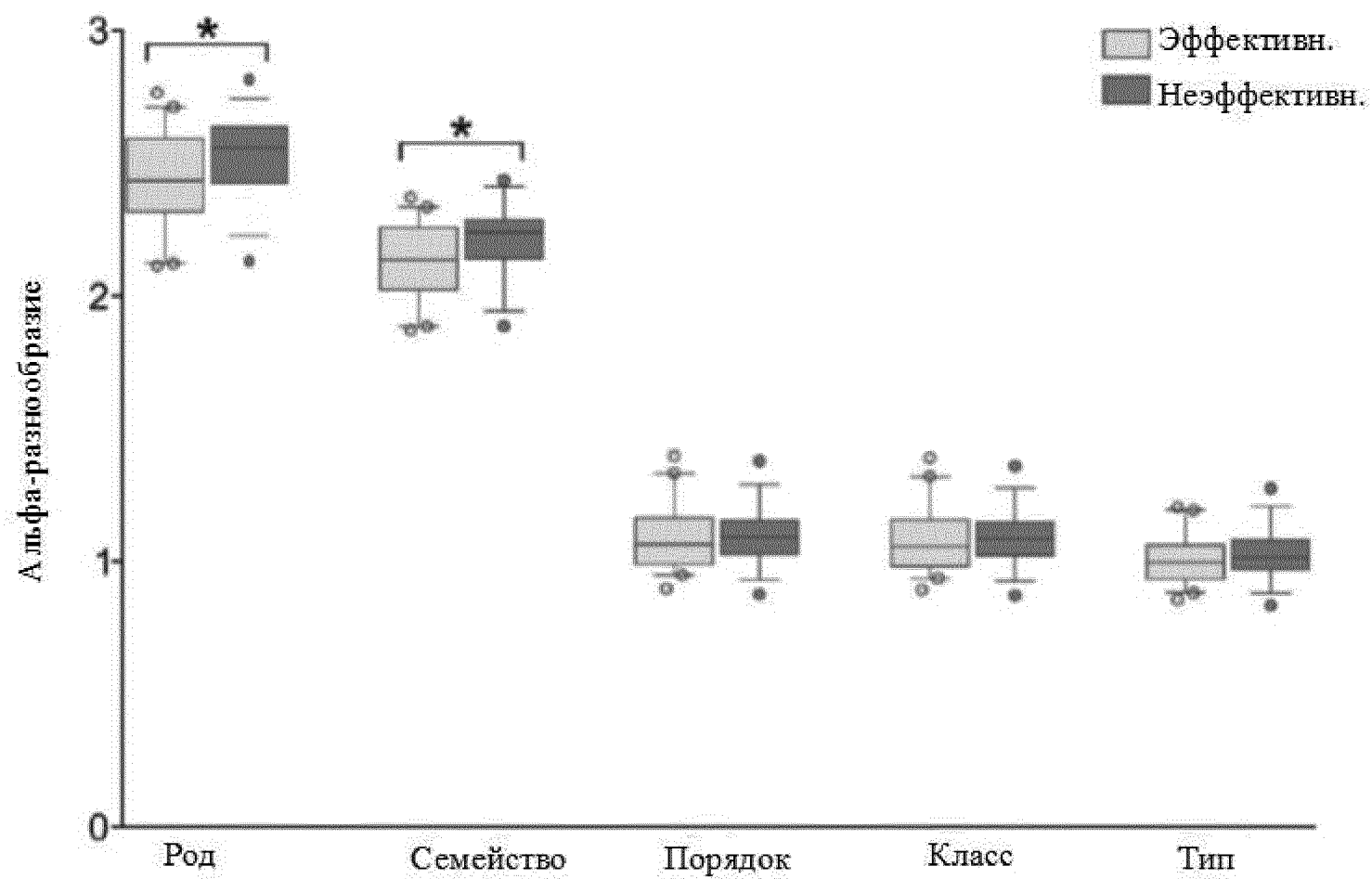
ФИГУРА 9



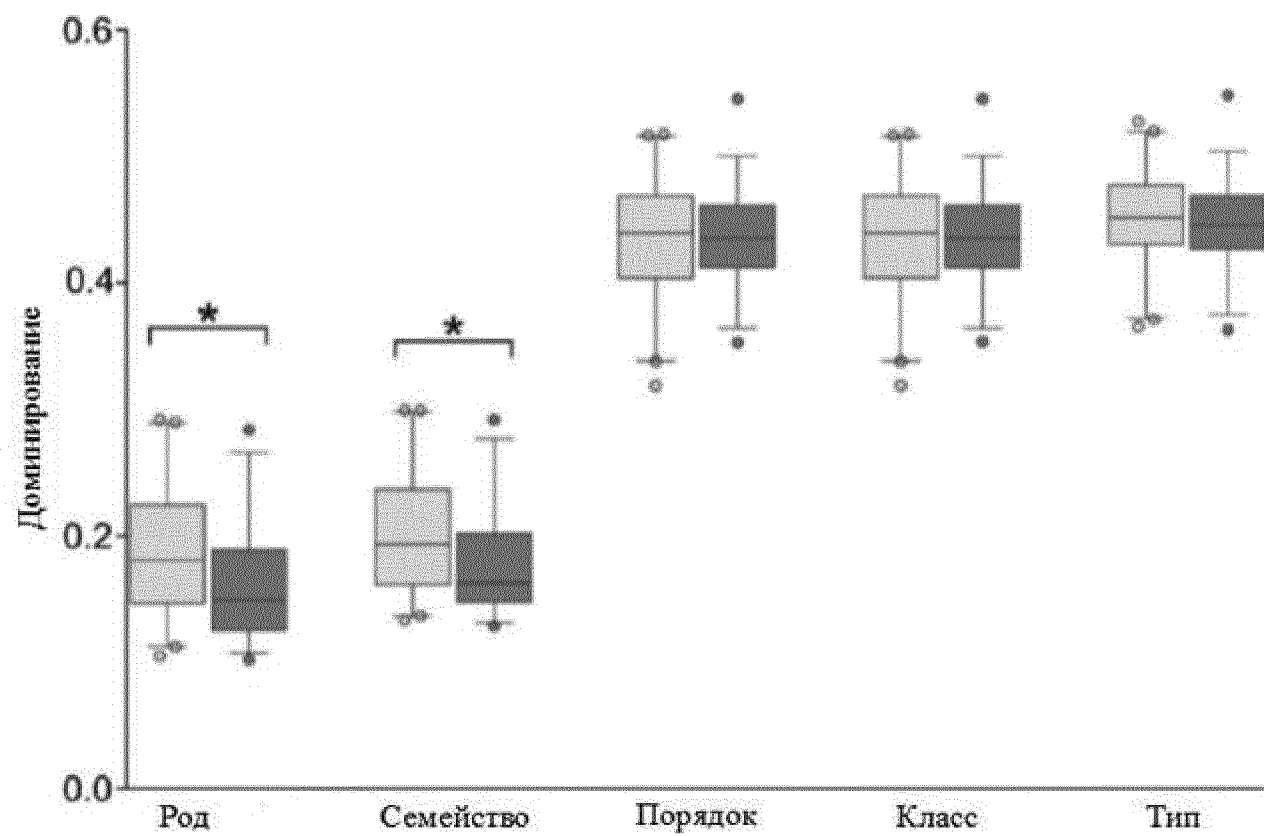
ФИГУРА 10



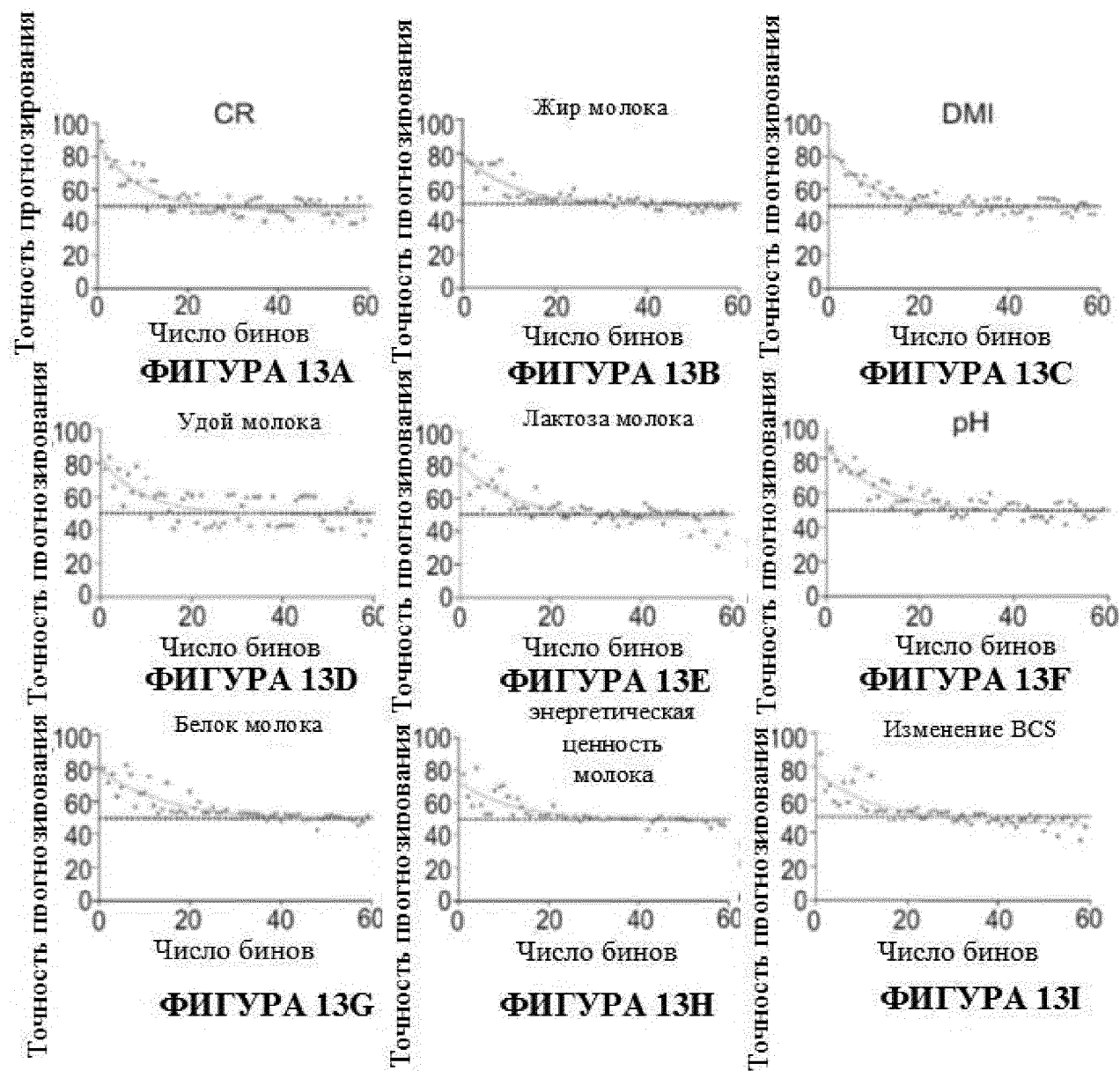
ФИГУРА 11

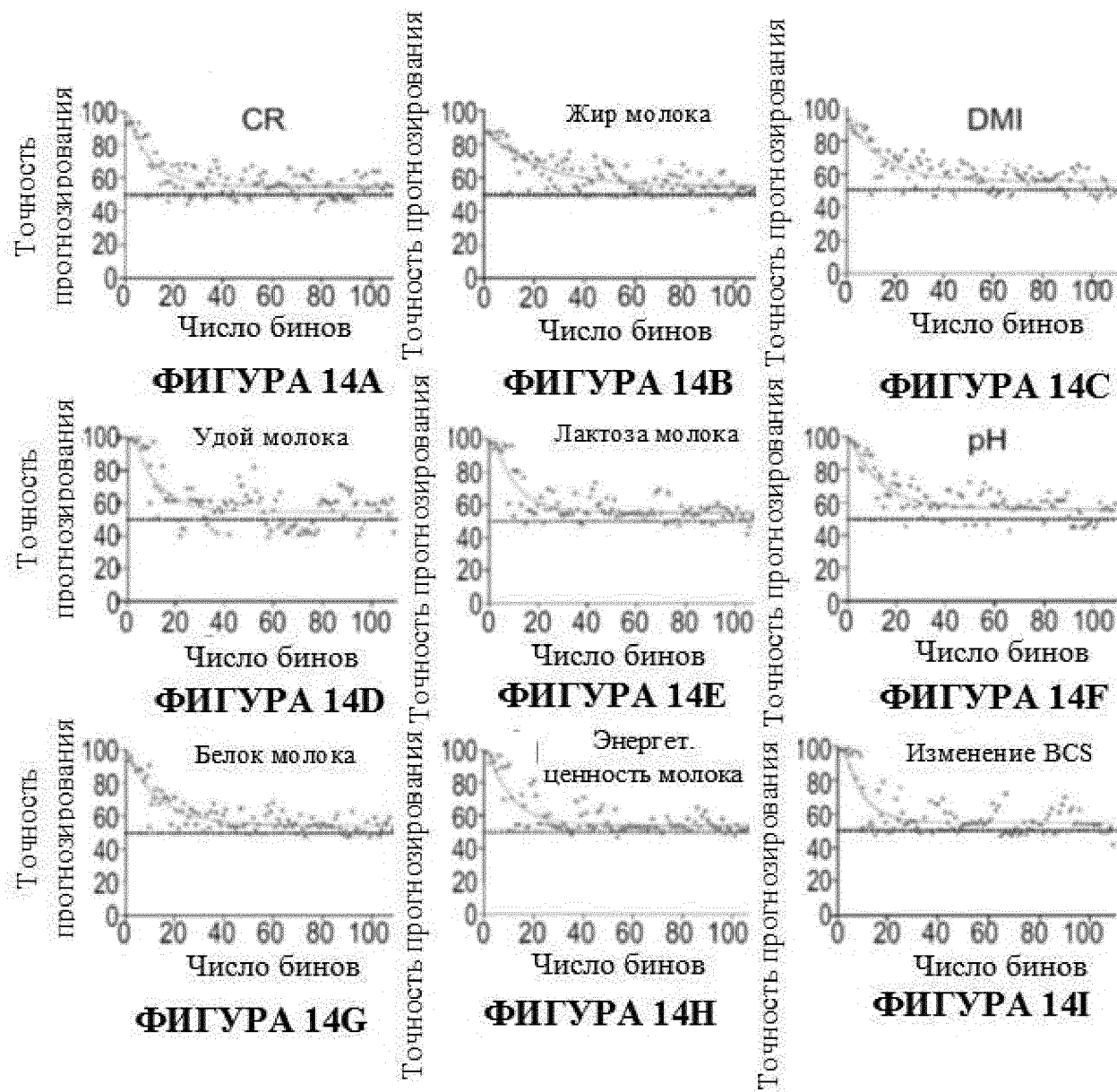


ФИГУРА 12А

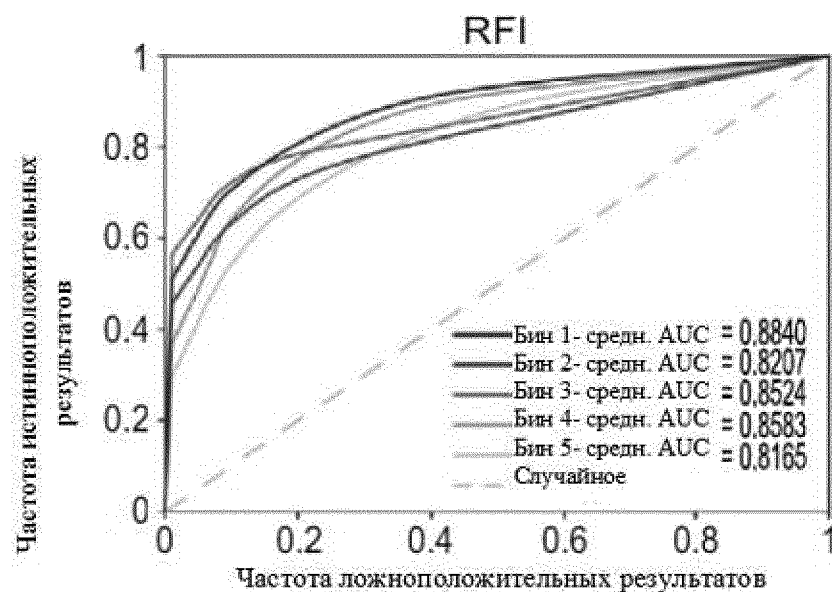


ФИГУРА 12В



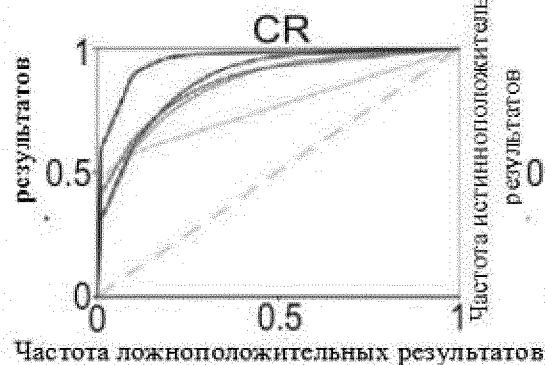


ФИГУРА 15А



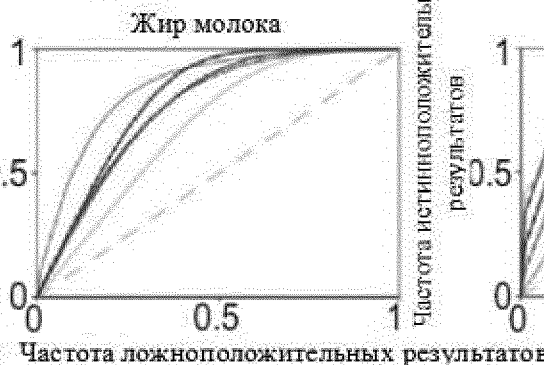
Частота истинноположительных результатов

ФИГУРА 15В



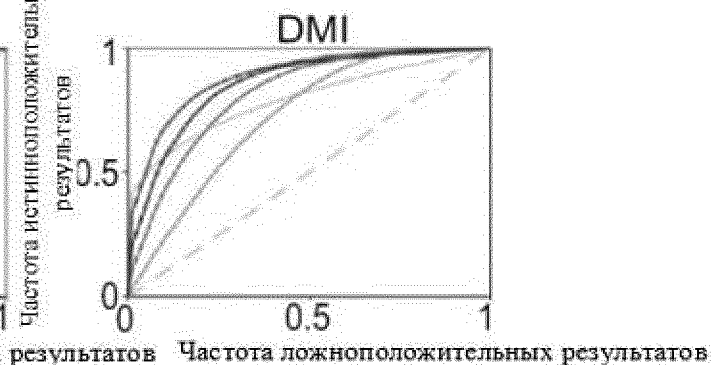
Бин 1- средн. AUC = 0.9542
 Бин 2- средн. AUC = 0.8783
 Бин 3- средн. AUC = 0.8639
 Бин 4- средн. AUC = 0.8533
 Бин 5- средн. AUC = 0.7623
 Случайное

ФИГУРА 15С



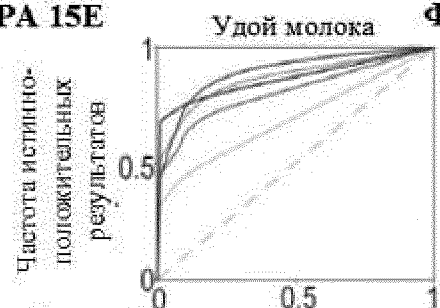
Бин 1- средн. AUC = 0.8035
 Бин 2- средн. AUC = 0.7724
 Бин 3- средн. AUC = 0.7625
 Бин 4- средн. AUC = 0.8484
 Бин 5- средн. AUC = 0.6904
 Случайное

ФИГУРА 15D



Бин 1- средн. AUC = 0.8554
 Бин 2- средн. AUC = 0.8880
 Бин 3- средн. AUC = 0.8146
 Бин 4- средн. AUC = 0.7254
 Бин 5- средн. AUC = 0.7927
 Случайное

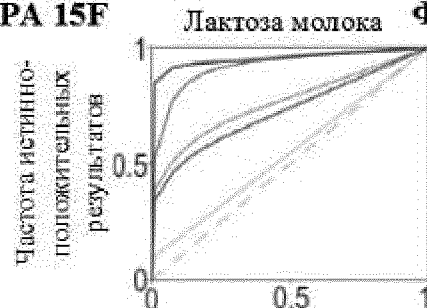
ФИГУРА 15Е



Частота ложноположительных результатов

- Бин 1- средн. AUC = 0,8647
- Бин 2- средн. AUC = 0,8941
- Бин 3- средн. AUC = 0,8067
- Бин 4- средн. AUC = 0,8656
- Бин 5- средн. AUC = 0,6914
- Случайное

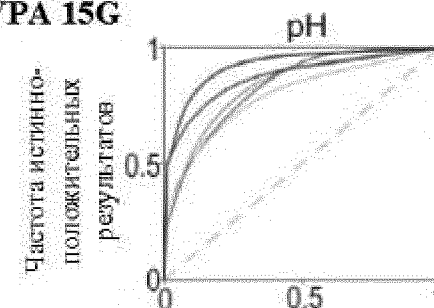
ФИГУРА 15F



Частота ложноположительных результатов

- Бин 1- средн. AUC = 0,9517
- Бин 2- средн. AUC = 0,7270
- Бин 3- средн. AUC = 0,9230
- Бин 4- средн. AUC = 0,7653
- Бин 5- средн. AUC = 0,5452
- Случайное

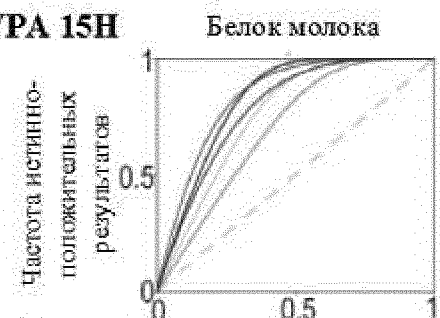
ФИГУРА 15G



Частота ложноположительных результатов

- Бин 1- средн. AUC = 0,9231
- Бин 2- средн. AUC = 0,8732
- Бин 3- средн. AUC = 0,8347
- Бин 4- средн. AUC = 0,8336
- Бин 5- средн. AUC = 0,7968
- Случайное

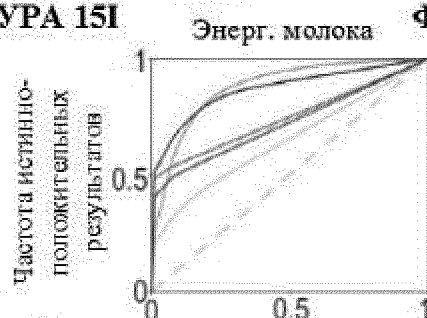
ФИГУРА 15H



Частота ложноположительных результатов

- Бин 1- средн. AUC = 0,8274
- Бин 2- средн. AUC = 0,7899
- Бин 3- средн. AUC = 0,8404
- Бин 4- средн. AUC = 0,6997
- Бин 5- средн. AUC = 0,7613
- Случайное

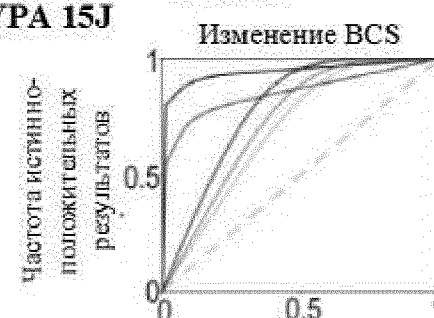
ФИГУРА 15I



Частота ложноположительных результатов

- Бин 1- средн. AUC = 0,8689
- Бин 2- средн. AUC = 0,7232
- Бин 3- средн. AUC = 0,7464
- Бин 4- средн. AUC = 0,8780
- Бин 5- средн. AUC = 0,6466
- Случайное

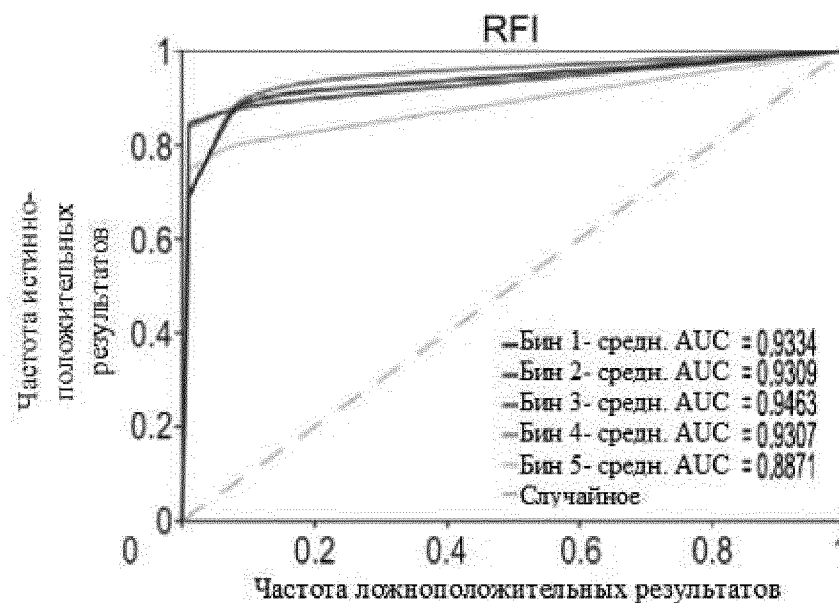
ФИГУРА 15J



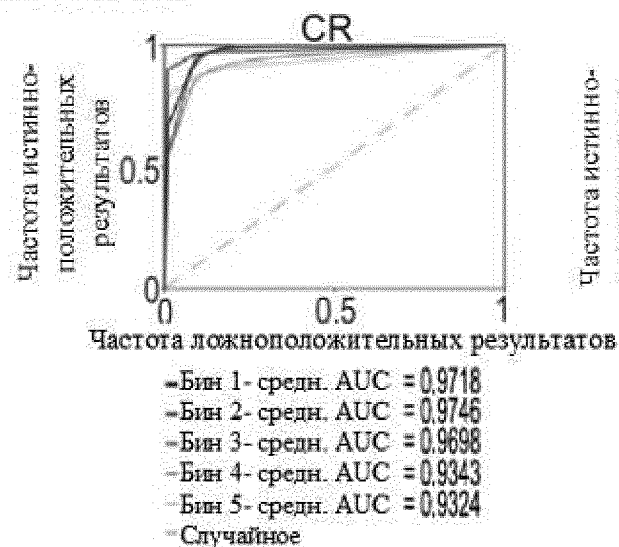
Частота ложноположительных результатов

- Бин 1- средн. AUC = 0,9448
- Бин 2- средн. AUC = 0,7917
- Бин 3- средн. AUC = 0,8558
- Бин 4- средн. AUC = 0,7366
- Бин 5- средн. AUC = 0,7014
- Случайное

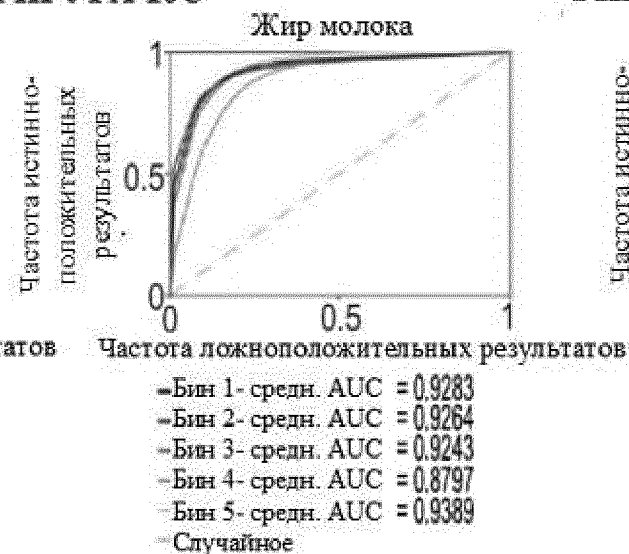
ФИГУРА 16А



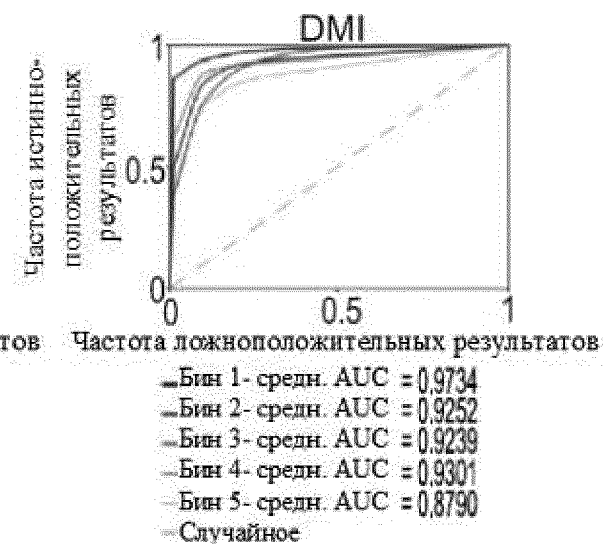
ФИГУРА 16В



ФИГУРА 16С

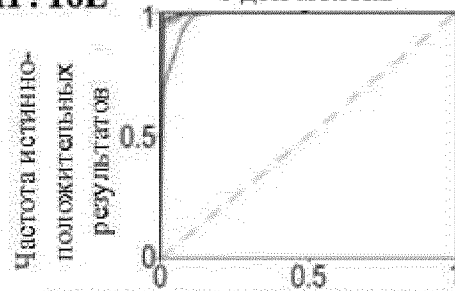


ФИГУРА 16D



ФИГ. 16Е

Удой молока

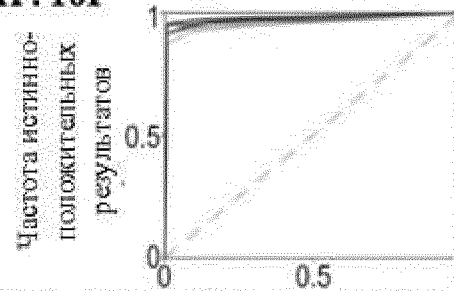


Частота ложноположительных результатов

- Бин 1-средн. AUC = 0.9936
- Бин 2-средн. AUC = 0.9949
- Бин 3-средн. AUC = 0.9794
- Бин 4-средн. AUC = 0.9920
- Бин 5-средн. AUC = 0.9949
- Случайное

ФИГ. 16F

Лактоза молока

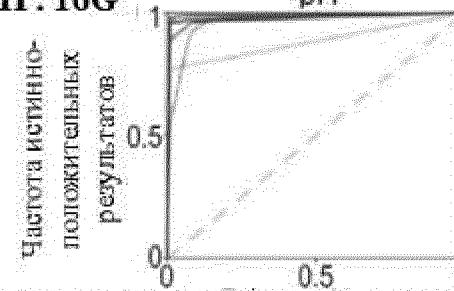


Частота ложноположительных результатов

- Бин 1-средн. AUC = 0.9785
- Бин 2-средн. AUC = 0.9705
- Бин 3-средн. AUC = 0.9739
- Бин 4-средн. AUC = 0.9617
- Бин 5-средн. AUC = 0.9546
- Случайное

ФИГ. 16G

pH

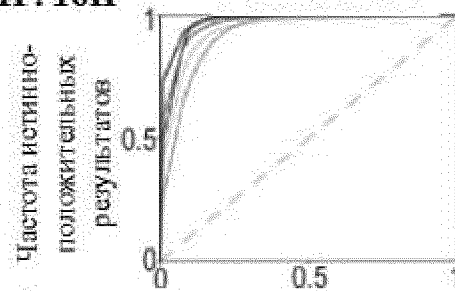


Частота ложноположительных результатов

- Бин 1-средн. AUC = 0.9793
- Бин 2-средн. AUC = 0.9894
- Бин 3-средн. AUC = 0.9738
- Бин 4-средн. AUC = 0.9604
- Бин 5-средн. AUC = 0.9807
- Случайное

ФИГ. 16H

Белок молока

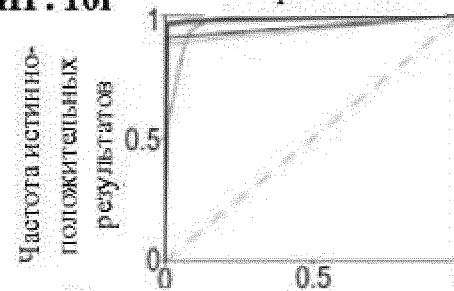


Частота ложноположительных результатов

- Бин 1-средн. AUC = 0.9767
- Бин 2-средн. AUC = 0.9661
- Бин 3-средн. AUC = 0.9629
- Бин 4-средн. AUC = 0.9245
- Бин 5-средн. AUC = 0.9374
- Случайное

ФИГ. 16I

Энерг. молока

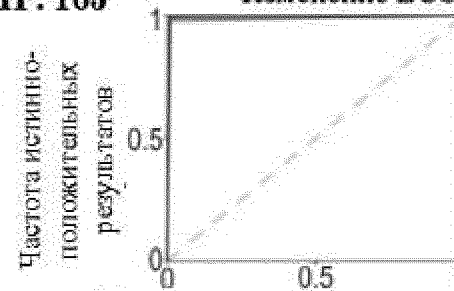


Частота ложноположительных результатов

- Бин 1-средн. AUC = 0.9623
- Бин 2-средн. AUC = 0.9487
- Бин 3-средн. AUC = 0.9794
- Бин 4-средн. AUC = 0.9699
- Бин 5-средн. AUC = 0.9364
- Случайное

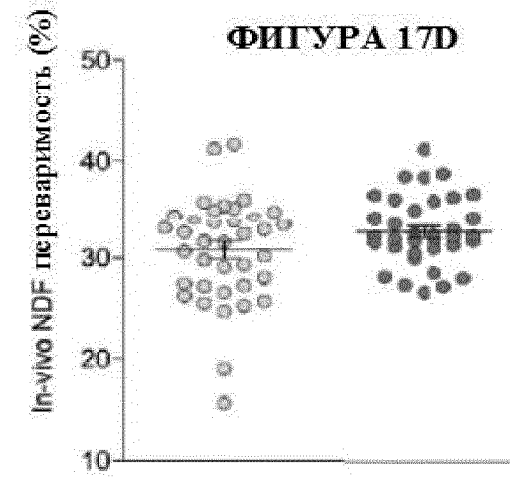
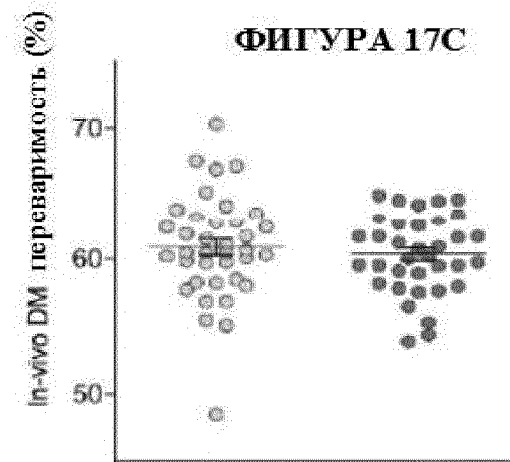
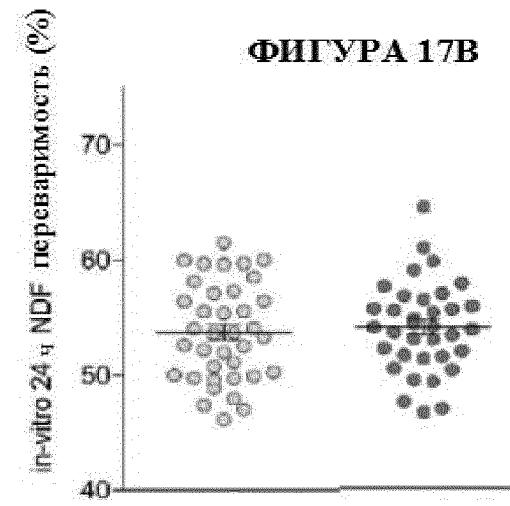
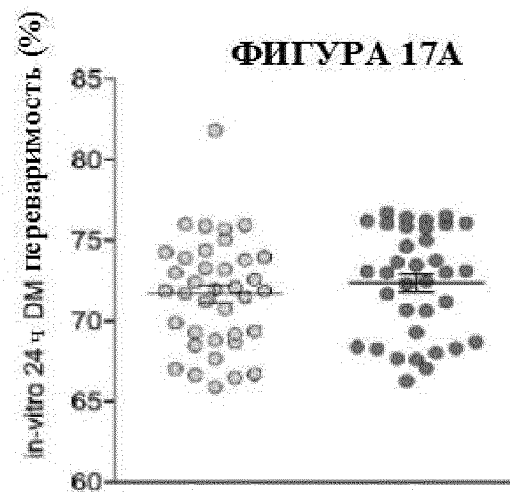
ФИГ. 16J

Изменение BCS

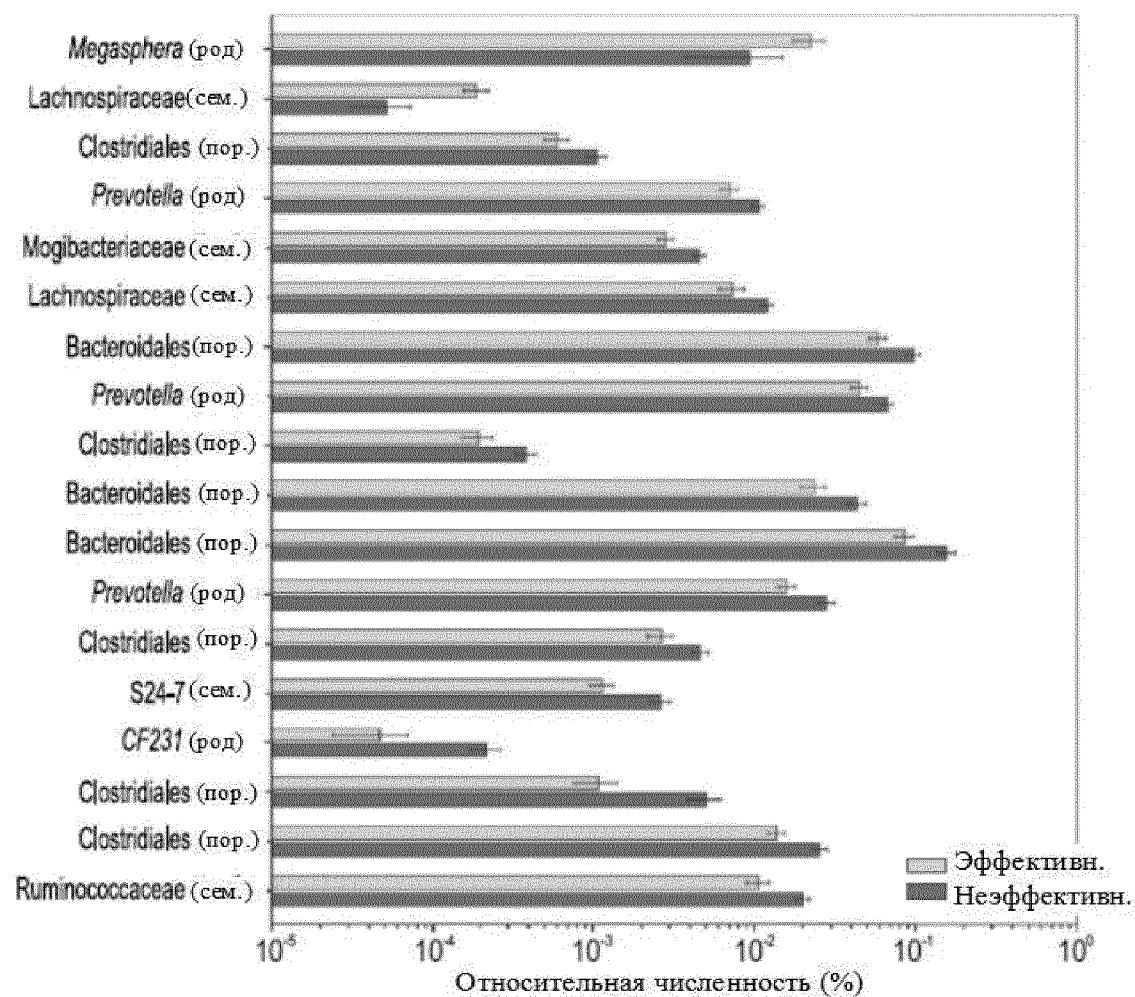


Частота ложноположительных результатов

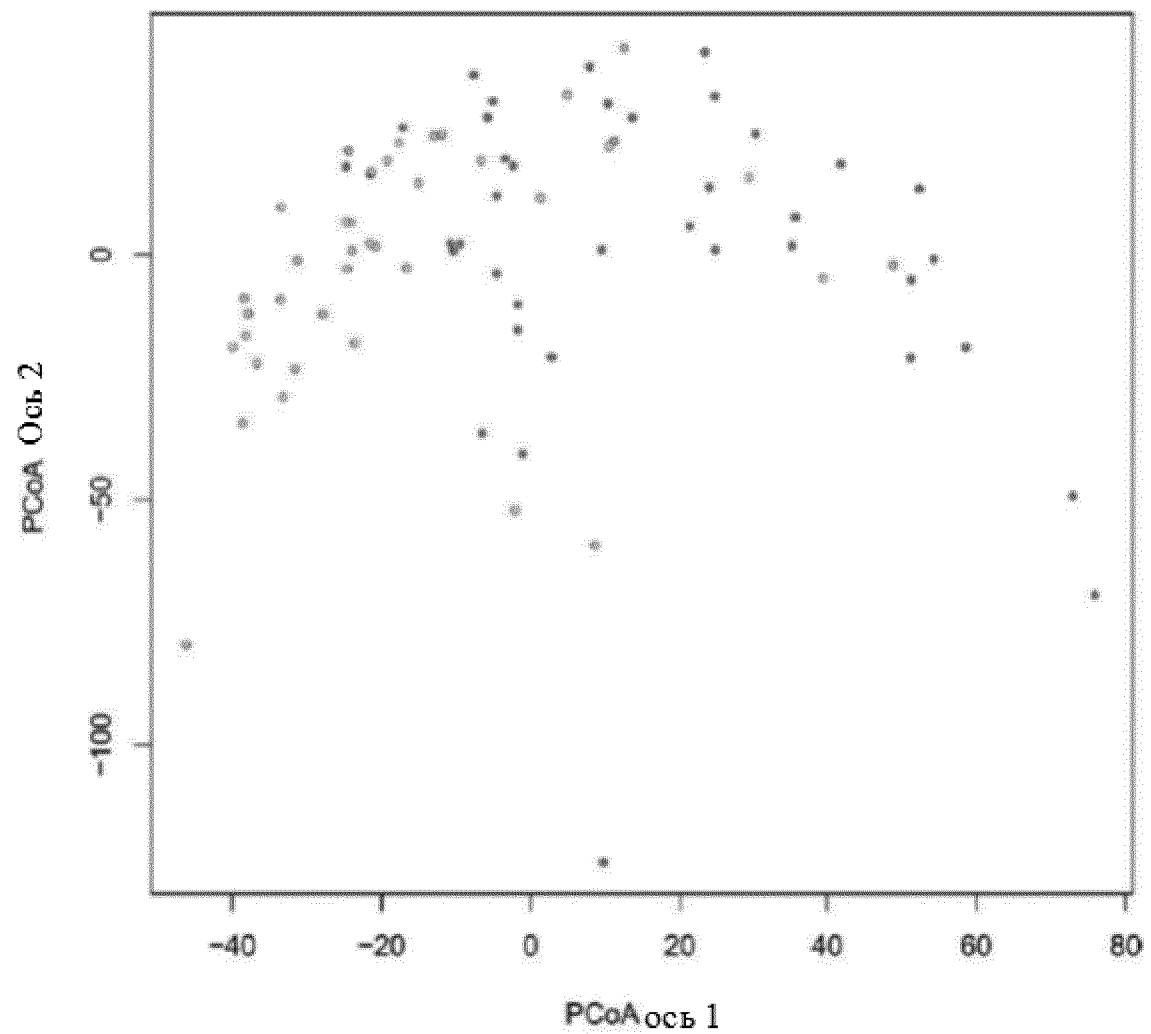
- Бин 1-средн. AUC = 0.9923
- Бин 2-средн. AUC = 0.9941
- Бин 3-средн. AUC = 0.9834
- Бин 4-средн. AUC = 0.9942
- Бин 5-средн. AUC = 0.9859
- Случайное



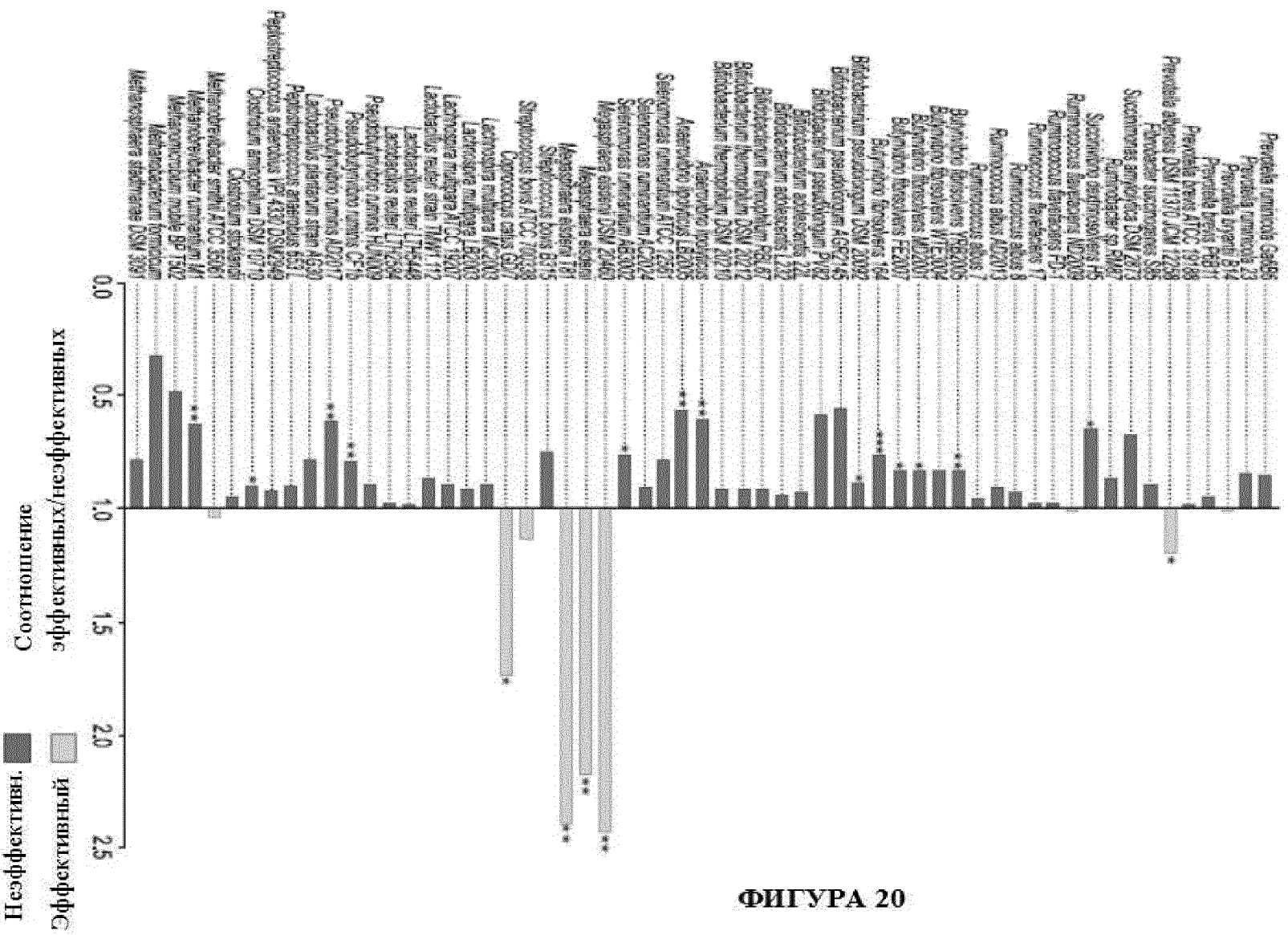
- Эффективн.
- Неэффективн.



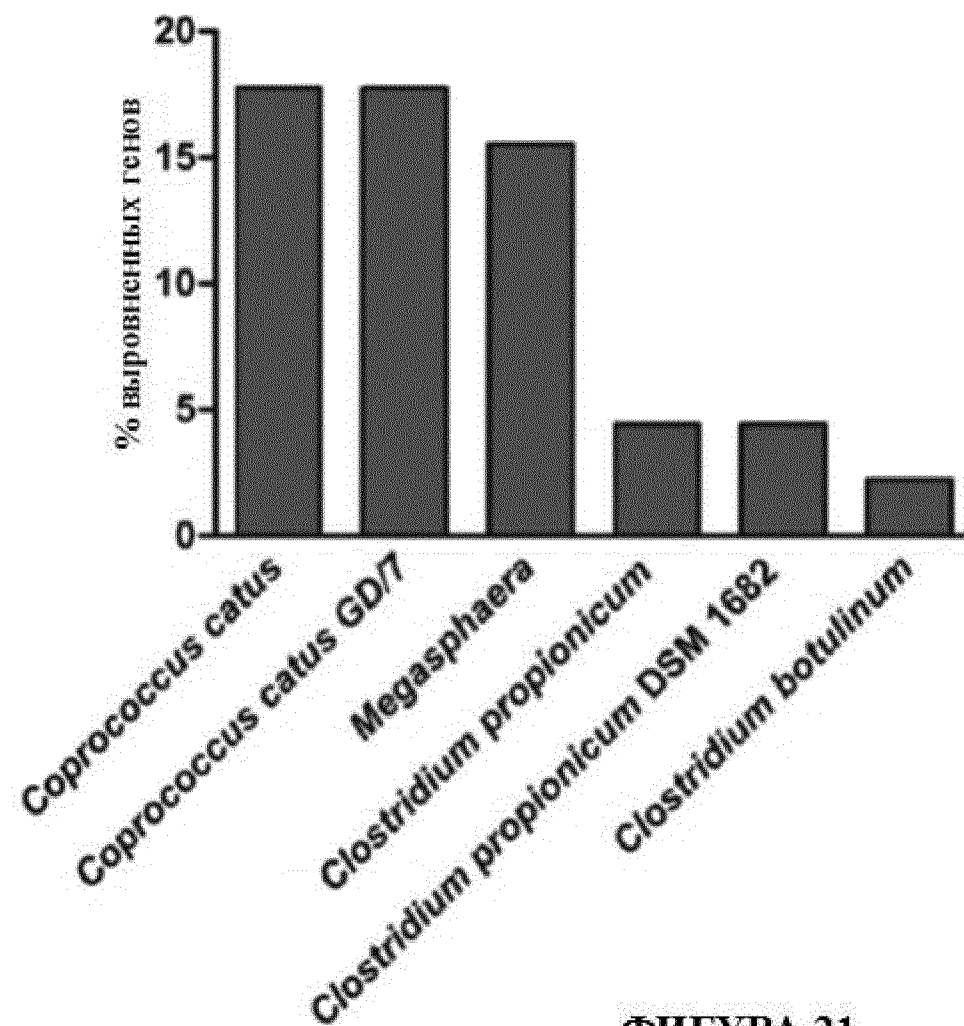
ФИГУРА 18



ФИГУРА 19



ФИГУРА 20



ФИГУРА 21