

DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-4-85-89

УДК 579.62: 577.29

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ГРИБКОВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ КИШЕЧНИКА СВИНЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ КОНВЕРСИЕЙ КОРМА

^{*,**}Сыромятников М.Ю. ORCID ID 0000-0001-9028-0613, ^{*}Шабунин С.В. ORCID ID 0000-0002-2689-6998, ^{***}Нестерова Е.Ю. ORCID ID 0000-0003-0918-3547, ^{***}Гладких М.И. ORCID ID 0000-0003-1173-1565, ^{***}Смирнова Ю.Д. ORCID ID 0000-0002-5820-1804, ^{***}Буракова И.Ю. ORCID ID 0000-0002-5881-0845, ^{***}Морозова П.Д. ORCID ID 0009-0000-0075-9170, ^{***}Грязнова М.В. ORCID ID 0000-0003-2076-3868, ^{*}Михайлов Е.В. ORCID ID 0000-0001-5457-1325

^{*}ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

^{**}ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,

г. Воронеж, Российская Федерация

^{***}ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,

г. Воронеж, Российская Федерация

*В работе представлены результаты исследования высокопроизводительного секвенирования грибного микробиома кишечника свиней, а также оценка влияния показателя конверсии корма на биоразнообразие грибного сообщества кишечника животных. Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей выявил в кишечнике свиней 3 бактериальных типа, в число которых вошли Ascomycota, Basidiomycota и Microsporidia. Доминирующими типами оказались Ascomycota и Basidiomycota. Наиболее многочисленными грибами на уровне семейства оказались представители Schizosaccharomycetaceae. Самым многочисленным видом в кишечном микробиоме свиней оказался Schizosaccharomyces pombe (относительное содержание для двух исследуемых групп составило $9,24 \pm 1,49$). На втором месте по распространенности был вид Colletotrichum higginsianum (относительное содержание для группы А – $5,44 \pm 0,98$, для группы Б – $5,97 \pm 0,76$) и Thermothielavioides terrestris (относительное содержание для группы А – $3,96 \pm 0,67$, для группы Б – $4,37 \pm 0,46$). Сравнительный биоинформатический анализ кишечного микробиома двух групп свиней с разным показателем конверсии корма не выявил достоверных различий на уровне типа, семейства и вида. Результаты демонстрируют необходимость дальнейшего детального изучения данного вопроса. **Ключевые слова:** грибы, микробиом, кишечник свиней, конверсия корма, гены, высокопроизводительное секвенирование.*

STUDY OF THE DIVERSITY OF FUNGAL MICROORGANISMS IN THE GUT OF SWINE WITH DIFFERENT FEED CONVERSION RATE

^{*,**}Syromyatnikov M.Yu., ^{*}Shabunin S.V., ^{***}Nesterova E.Yu., ^{***}Gladkikh M.I., ^{***}Smirnova Yu.D., ^{***}Burakova I.Yu., ^{***}Morozova P.D., ^{***}Gryaznova M.V., ^{*}Mikhaylov E.V.

^{*}FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy",
Voronezh, Russian Federation

^{**}FSBEI HE "Voronezh State University",

Voronezh, Russian Federation

^{***}FSBEI HE "Voronezh State University of Engineering Technologies",

Voronezh, Russian Federation

*The paper presents the results of study on high-throughput sequencing of the fungal microbiome in the intestinal tract of swine, as well as an assessment of the influence of the feed conversion rate on the biodiversity of the fungal community of the intestinal tract of animals. Bioinformatic analysis of nucleotide sequences revealed 3 bacterial phyla in the gut of swine, including Ascomycota, Basidiomycota and Microsporidia. The dominant phyla were Ascomycota and Basidiomycota. The most numerous fungi at the family level were representatives of Schizosaccharomycetaceae. The most abundant species in the intestinal microbiome of swine was Schizosaccharomyces pombe (the relative abundance for the two study groups was 9.24 ± 1.49). In the second place in prevalence was the species Colletotrichum higginsianum (relative abundance for group A: 5.44 ± 0.98 , for group B 5.97 ± 0.76) and Thermothielavioides terrestris relative abundance for group A: 3.96 ± 0.67 , for group B 4.37 ± 0.46). A comparative bioinformatic analysis of the intestinal mycobiome of two groups of swine with different feed conversion rates did not reveal significant differences at the level of phylum, family and species. The results demonstrate the need for further detailed study of this issue. **Keywords:** fungi, microbiome, gut of swine, feed conversion, genes, high-throughput sequencing.*

Введение. Конверсия корма в свиноводстве – один из важнейших экономических показателей предприятия. Он используется для измерения эффективности корма. Высокие значения конверсии приводят к относительно высоким ценам на свинину в результате повышенных затрат на кормле-

ние. Таким образом, снижение данного показателя у свиней, выращиваемых на крупных свиноводческих предприятиях, представляет собой важную стратегию минимизации затрат на производство свинины [1].

В настоящее время идет непрерывный поиск факторов, которые могли бы обеспечить лучшую свариваемость кормов и увеличение показателей привеса животных. Кормление напрямую связано с кишечной микробиотой, поскольку последняя выполняет первостепенную роль в усвояемости питательных элементов, углеводном обмене, а также влияет на здоровье и иммунитет животного. Микробиом кишечника представляет собой сложную систему взаимодействующих между собой множества разнообразных популяций бактерий и грибов [1]. Однако в основном подобные исследования сосредоточены на изучении бактериологического состава кишечного микробиома свиней.

В последнее время растет число публикаций, посвященных грибному микробиому. Так, в одном из исследований было показано, что вид *Kazachstania slooffiae* является наиболее обильным для кишечника отлученных от молока поросят [2]. Также в кишечнике свиней были обнаружены грибы родов *Saccharomycopsis*, *Mrakia*, *Wallemia*, *Cantharellus*, *Eurotium*, *Solicocozyma* и *Penicillium* [3]. С возрастом микробиом может меняться, так относительная численность родов *Kazachstania* и *Aureobasidium* значительно снижалась, тогда как относительная численность таких родов, как *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Simpliillium* и *Candida*, увеличивалась по мере взросления поросят [4].

Данное исследование было направлено на изучение грибного микробиома кишечника взрослых свиней и его связи с показателем конверсии корма.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследования выступало содержимое толстого отдела кишечника, полученное от клинически здоровых свиней (n=12). Животных разделили на 2 группы согласно коэффициенту конверсии корма: низкая конверсия корма (А) со средним коэффициентом конверсии 2,00 (n=6) и высокая конверсия корма (Б) со средним коэффициентом конверсии 2,22 (n=6).

Для экстракции ДНК из образцов использовали коммерческий набор HiPure DNA Micro Kit (Magen, Гуанчжоу, Китай). Выделение проводили согласно протоколу производителя. Библиотеки секвенирования готовили по следующему протоколу: ДНК фрагментировали с использованием набора MGIEasy Fast FS Library Prep Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай) с последующей очисткой магнитными частицами MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Лигирование адаптеров проводили с комплектом адаптеров А для праймеров MGIEasy UDB (MGI, Шэньчжэнь, Китай) и ПЦР-амплификацией. Качество библиотеки ДНК оценивали с использованием Qubit и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США).

Дальнейшую циркуляризацию одной нити осуществляли с использованием модуля MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Окончательные библиотеки были объединены и секвенированы с использованием платформ секвенирования MGI DNBSEQ-G50 с моделью проточной ячейки для секвенирования DNBSEQ-G50RS: FCL (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Для создания DNB использовался набор для высокопроизводительного секвенирования DNBSEQ-G50RS. Качество необработанных метагеномных данных оценивали с помощью инструмента FastQC. Технические последовательности и базы низкого качества (Q < 30) были обрезаны с помощью fastp. Таксономическое профилирование образцов было выполнено с использованием Kraken2 со стандартными базами данных для эукариот.

Результаты исследований. Биоинформатический анализ результатов секвенирования позволил идентифицировать до вида подавляющее большинство полученных нуклеотидных последовательностей. В сумме высокопроизводительное секвенирование 12 образцов микробиома свиней позволило получить 151724 рида. Количественный состав ридов, полученных в результате анализа образцов из группы А, был равен 7550, а группы Б – 76174. Согласно современной номенклатуре было идентифицировано 3 типа, 11 классов, 15 отделов, 27 семейств и 47 родов грибов.

Сравнительный биоинформатический анализ данных результатов секвенирования микробиомов двух групп свиней не зафиксировал достоверных различий на уровне типа. Анализ нуклеотидных последовательностей выявил 3 бактериальных филума: *Ascomycota*, *Basidiomycota* и *Microsporidia* (рисунок 1). Наименьшее значение относительного содержания грибов в данной выборке приходилось на представителей типа *Microsporidia*.

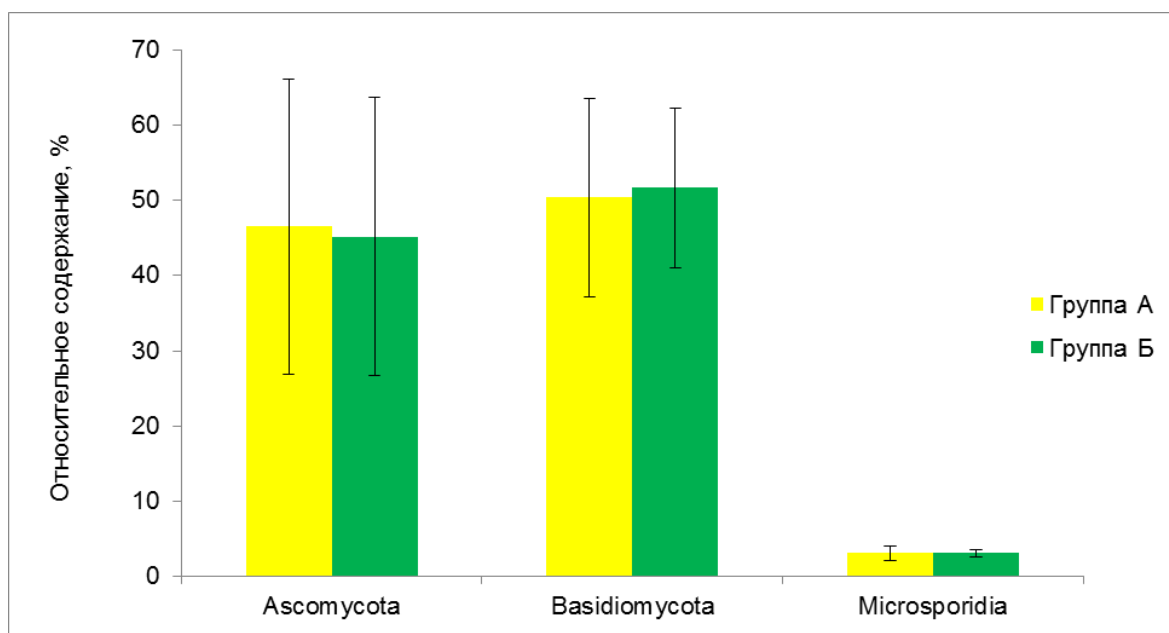


Рисунок 1 – Распространенность грибных филумов в микробиоме свиней

Для анализа на уровне семейств были отброшены те группы, чье процентное содержание составляло менее 1%. На рисунке 2 отражены результаты расчета показателя относительного содержания 26 семейств. Исследование грибного микробиома кишечника свиней на уровне семейства также не выявило разницу между группой А и группой Б.

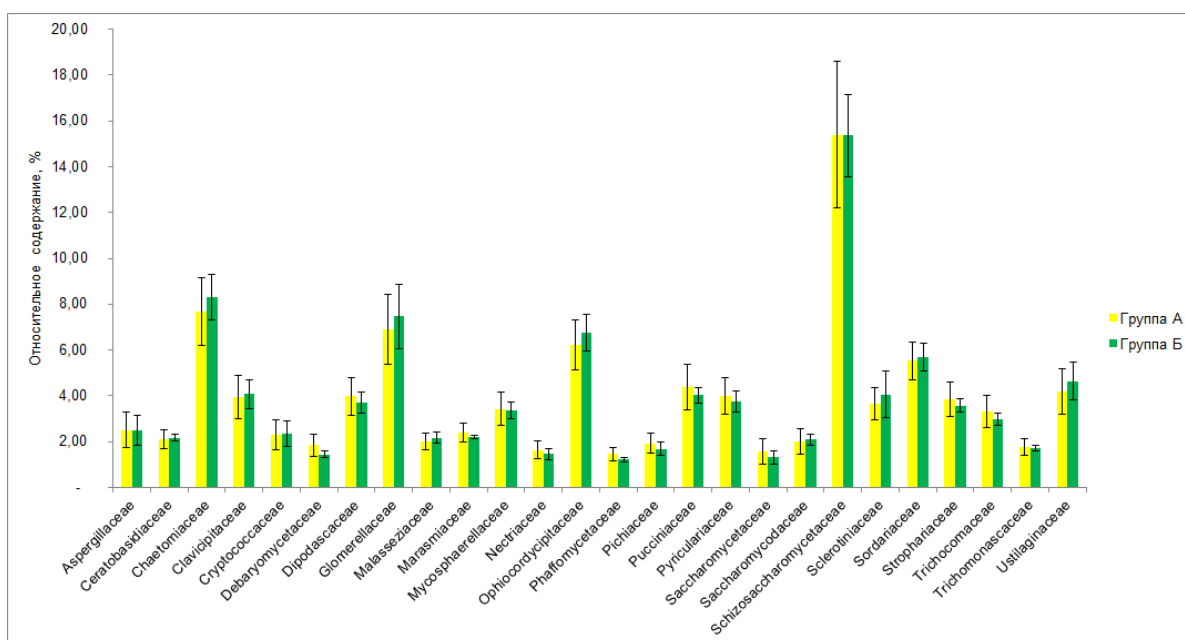


Рисунок 2 – Распространенность семейств грибов в микробиоме свиней

Наиболее многочисленными грибами в выборке оказались представители семейства *Schizosaccharomycetaceae*, чье процентное содержание составило $15,40 \pm 3,20$ для группы А и $15,36 \pm 1,79$ – для группы Б. Помимо них, микробиом был обилен грибами из семейств *Chaetomiaceae*, *Glomerellaceae*, *Ophiocordycipitaceae* и *Sordariaceae*.

Не было отмечено достоверных различий и в результате исследования грибов на уровне вида. По подобию анализа на уровне семейства, в выборке участвовали лишь те виды, чье относительное содержание было равно или превышало 1. В грибковом сообществе микробиома свиней нами было определено 39 видов (рисунок 3).

Colletotrichum higginsianum, *Thermothielavioides terrestris*, *Drechmeria coniospora*, *Purpureocillium takamizusanense*, *Thermothelomyces thermophiles*, *Neurospora crassa* и *Sporisorium graminicola*, что составляло 34% всех образцов в фекальной микробиоте исследуемой выборки свиней.

Conclusion. To date, the diversity and fungal microbiome in gut of swine are still not fully understood. For this reason, research in this area is relevant. We carried out high-throughput sequencing of the fungal microbiome of 12 adult swine, divided into group A and group B according to the feed conversion rate. Bioinformatic analysis of nucleotide sequences revealed no phyla, families, or species significantly different in relative abundance between the two groups. The predominant fungal phyla were found to be Ascomycota and Basidiomycota with Schizosaccharomycetaceae, Chaetomiaceae, Glomerellaceae, Ophiocordycipitaceae and Sordariaceae as the dominant families. Eight predominant species were identified, including *Schizosaccharomyces pombe*, *Colletotrichum higginsianum*, *Thermothielavioides terrestris*, *Drechmeria coniospora*, *Purpureocillium takamizusanense*, *Thermothelomyces thermophiles*, *Neurospora crassa* and *Sporisorium graminicola*, which accounted for 34% of all samples in the fecal microbiota of the studied sample of swine.

Список литературы. 1. Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine / M. Bergamaschi [et al.] // *Microbiome*. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 110. – doi: 10.1186/s40168-020-00888-9. 2. Core-predominant gut fungus *Kazachstania slooffiae* promotes intestinal epithelial glycolysis via lysine desuccinylation in pigs / J. Hu [et al.] // *Microbiome*. – 2023. – Vol. 11, № 1. – P. 31. – doi: 10.1186/s40168-023-01468-3. 3. The nutritional significance of intestinal fungi: alteration of dietary carbohydrate composition triggers colonic fungal community shifts in a pig model / Y. Luo [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2021. – Vol. 87. – P. 21. – doi: 10.1128/AEM.00038-21. 4. Gradual changes of gut microbiota in weaned miniature piglets / J. Hu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1727. – doi: 10.3389/fmicb.2016.01727. 5. Phytase produced using *Schizosaccharomyces pombe* ASP595-1 strain (Genetically Modified Feed Additives). Food Safety Commission of Japan (Food Safety Tokyo). – 2017. – Vol. 5, № 2. – P. 72–73. – doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2017001s. 6. Tsushima, A. Genomic resources of *Colletotrichum* fungi: development and application / A. Tsushima, K. Shirasu // *Journal of General Plant Pathology*. – 2022. – Vol. 88. – P. 349–357. – doi: 10.1007/s10327-022-01097-y. 7. Genomic and transcriptomic analysis of the thermophilic lignocellulose-degrading fungus *Thielavia terrestris* LPH172 / M. Tölgo [et al.] // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. – 2021. – Vol. 14, № 1. – P. 131. – doi: 10.1186/s13068-021-01975-1. 8. Nematophagous fungi from decomposing cattle faeces in Argentina / C. A. Saumell [et al.] // *Revista Iberoamericana de Micología*. – 2015. – Vol. 32, № 4. – P. 252–256. – doi: 10.1016/j.riam.2014.09.003. 9. Singh, B. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential / B. Singh // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 36, № 1. – P. 59–69. – doi: 10.3109/07388551.2014.923985. 10. Host factors associated with gut mycobiome structure / N. Szóstak [et al.] // *mSystems*. – 2023. – Vol. 8, № 2. – P. e0098622. – doi: 10.1128/mSystems.00986-22.

Поступила в редакцию 10.10.2023.

DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-4-89-95

УДК 579.62: 577.29

ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ В КИШЕЧНИКЕ ПОРОСЯТ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*) В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

****Сыромятников М.Ю. ORCID ID 0000-0001-9028-0613, *Шабунин С.В. ORCID ID 0000-0002-2689-6998, **Нестерова Е.Ю. ORCID ID 0000-0003-0918-3547, ***Гладких М.И. ORCID ID 0000-0003-1173-1565, ***Смирнова Ю.Д. ORCID ID 0000-0002-5820-1804, ****Буракова И.Ю. ORCID ID 0000-0002-5881-0845, ****Морозова П.Д. ORCID ID 0009-0000-0075-9170, ****Грязнова М.В. ORCID ID 0000-0003-2076-3868, *Михайлов Е.В. ORCID ID 0000-0001-5457-1325

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

**ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,

г. Воронеж, Российская Федерация

***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,

г. Воронеж, Российская Федерация

В статье представлена оценка наличия и относительного содержания генов антибиотикорезистентности бактерий в кишечном микробиоме поросят в раннем неонатальном периоде. Доминирующим большинством из присутствующих генов антибиотикорезистентности как у здоровых, так и у больных поросят стали гены к бета-лактамам антибиотикам (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы). Гены резистентности к тетрациклинам также содержались в образцах здоровых и больных животных. У здоровых животных присутствовал ген устойчивости к аминогликозидам *Aph3-III* (относительное содержание 81,15%). Гены резистентности к хинолоновым антибиотикам *QnrB5* и *QnrB19* присутствовали как у здоровых, так и у больных животных, а ген *QnrD* был идентифицирован только у поросят с диа-