№ 69. – Р. 1531854. 8. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным / А. В. Рыбакова [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2018. - № 8 (4). – С. 207-217. 9. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии / И. П. Кондрахин [и др.]. – Москва : Агропромиздат, 1989. – 256 с. 10. Александровская, О. В. Цитология, гистология, эмбриология / О. В. Александровская, Т. Н. Радостина, Н. А. Козлов. – Москва : Агропромиздат, 1987. – 448 с.

УДК 619:616.98:579.852.13

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА МИКРОБИОМА ТЕЛЯТ МЕТОДОМ NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

* Йылдырым Е.А., *Ильина Л.А., *Филиппова В.А., **Тюрина Д.Г., **Лаптев Г.Ю.,
**Калиткина К.А., **Пономарева Е.С., **Ключникова И.А., **Заикин В.А.,
**Дубровин А.В.

*Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, г. Санкт-Петербург,
Пушкин, Российская Федерация

**ООО «БИОТРОФ», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

*С применением молекулярно-генетического метода NGS-секвенирования установлено, что в образцах рубцового содержимого телят с диареей были обнаружены дисбиотические нарушения: снижение нормобиоты и повышение патогенных форм: эризипелотриксос, фузобактерий и стрептококков. **Ключевые слова:** телята, рубец, диарея, NGS-секвенирование, микробиом.*

STUDYING THE MICROBIOME COMPOSITION OF CALVES USING NGS-SEQUENCING METHOD

*Yildirim E.A., *Ilina L.A., *Filippova V.A., **Turina D.G., **Laptev G.Yu.,
**Kalitkina K.A., **Ponomareva E.S., **Klyuchnikova I.A., **Zaikin V.A.,
**Dubrovin A.V.

*Sankt-Petersburg State Agrarian University, Sankt-Petersburg, Pushkin, Russian
Federation

**BIOTROF LLC, Sankt-Petersburg, Russian Federation

*Using the molecular genetic method of NGS sequencing, it was established that dysbiotic disorders were found in samples of the rumen contents of calves with diarrhea: a decrease in normobiota and an increase in pathogenic forms: Erysipelothrix, Fusobacteria and Streptococcus. **Keywords:** calves, rumen, diarrhea, NGS sequencing, microbiome.*

Введение. В условиях интенсивного животноводства и снижения адаптационного потенциала у коров могут возникать выраженные реакции на стресс, при которых животные становятся более восприимчивыми к инфекциям,

вызываемым потенциально инфекционными бактериями, содержащимися в кормах и в организме. Сложный полимикробный состав пищеварительной микробиоты скота играет ключевую роль в состоянии здоровья, развитии заболеваний, включая проблемы воспроизводства, срока хозяйственного использования. Хотя известно, что рубец теленка недостаточно развит, на ранних стадиях молоко, в основном, обходит рубец и попадает в сычуг через пищеводный желоб. Тем не менее, микробиом рубца телят имеет решающее значение для развития тканей эпителия пищеварительной системы, здоровья хозяина на протяжении всей жизни, формирования репродуктивных качеств телочек (Guan et al., 2008). Выработка летучих жирных кислот (ЛЖК) имеет решающее значение в раннем периоде развития рубца, поскольку они стимулируют кровоток, подвижность рубца и рост эпителия, которые являются важными факторами для улучшения усвоения питательных веществ (Woodruff et al., 2022). У молочных коров с нарушенным микробиомом рубца повышается риск возникновения метаболических расстройств, ацидоза, родильного пареза, эндометритов. Первоосновой формирования жизнеспособных ремонтных телок с хорошими параметрами воспроизводства является правильное формирование микробиома рубца для усиления адаптивного потенциала и иммунитета всего организма.

Материалы и методы исследований. Был исследован микробиом рубцового содержимого телят 4-6 месяцев черно-пестрой голштинизированной породы с признаками диареи из 3-ех ферм европейской части России: пробы №1, 2 – из фермы в Ленинградской области; пробы №3, 4 - из фермы Московской области; проба №5, 6 - из фермы Курской области. Тотальную ДНК для анализа состава микробиоты рубца выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Бактериальное сообщество оценивали методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США) с праймерами для V3-V4 региона гена 16S рНК: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG- 3' (прямой праймер), 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC- 3' (обратный праймер). Секвенирование проводили при помощи реагентов для подготовки библиотек Nextera® XT IndexKit («Illumina, Inc.», США), для очистки ПЦР- продуктов Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter, Inc.», США) и для проведения секвенирования MiSeq® ReagentKit v2 (500 cycle) («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2 x 250 п.н. Автоматический биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения QIIME2 ver. 2020.8 (<https://docs.qiime2.org/2020.8/>). Фильтрацию шумовых последовательностей проводили с помощью встроенного в программное обеспечение QIIME2 пакета DADA2, включающего информацию о качестве последовательностей в свою модель ошибок (фильтрацию химерных последовательностей, артефактов, адаптеров), что делает алгоритм устойчивым к последовательности более низкого качества. Для построения филогении de novo выполнили множественное выравнивание последовательностей, применяя программный пакет MAFFT, далее проводили маскированное выравнивание, чтобы удалить позиции, которые значительно различались. Для назначения таксономии использовали программное обеспечение QIIME2, которое присваивает последовательности

таксономическую идентификацию на основе данных ASV (методами BLAST, RDP, RTAX, mothur и uclust), используя базу данных по 16s rRNA Silva 138.1 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138.1/>).

Математическую и статистическую обработку результатов осуществляли методом многофакторного дисперсионного анализа (multifactor ANalysis Of VAriance, ANOVA) в программах Microsoft Excel XP/2003, R-Studio (Version 1.1.453) (<https://rstudio.com>).

Результаты исследований. Проведенными исследованиями с применением молекулярно-генетического метода NGS-секвенирования установлено, что в образцах рубцового содержимого телят с диареей было в среднем обнаружено 530 видов микроорганизмов. Среди них были выявлены представители нормальной, условно-патогенной и патогенной микробиоты. Целлюлозолитические бактерии в рубцовом содержимом исследованных телят, в основном, были представлены семействами *Prevotellaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Thermoanaerobacteraceae*. В частности, были обнаружены непатогенные виды семейства *Clostridiaceae*, синтезирующие целлюлозолитические ферменты. Целлюлозолитические бактерии – это основные бактерии рубца жвачных, расщепляющие клетчатку растительных кормов до ЛЖК. Был зарегистрирован большой разброс в содержании полезных целлюлозолитических бактерий: от 34,4 % до 84,8 % в зависимости от образца. Всего было обнаружено более 170 различных видов целлюлозолитических микроорганизмов. Содержание ЛЖК-синтезирующих бактерий в рубце телят было также невысоко и неоднородно – от 0,4 % в пробе №6 до 5,5 % в пробе №3. Необходимо отметить, что в трех пробах от телят (пробы №4, №5 и №6) содержание ЛЖК-синтезирующих бактерий было менее 1 %. ЛЖК-синтезирующие бактерии ферментируют молочную кислоту, образуемую бактероидами до летучих жирных кислот, используемых организмом для получения энергии. Низкое содержание ЛЖК-синтезирующих бактерий может свидетельствовать о дисбиотических нарушениях в организме телят, что, вероятно, связано с наблюдавшимися у телят диареями.

Доля бифидобактерий в пробах рубцового содержимого рубца телят была крайне мала и различалась между исследованными пробами (от 0 до 0,3 %). Функции бифидобактерий в пищеварительном тракте - это антимикробная активность, иммуномодулирующая активность, синтез витаминов и некоторых незаменимых аминокислот. Особый интерес представляло более высокое содержание бифидобактерий в пробе №5 по сравнению с остальными образцами, поскольку данный разброс между показателями бифидобактерий может свидетельствовать о низкой защищенности организма телят от колонизации представителями патогенной и условно-патогенной микробиоты.

Суммарная доля таксонов, представители которых нередко участвуют в процессах патогенеза, в исследованных пробах рубцового содержимого телят колебалась от 0,55 до 1,17 %. При этом было отмечено, что в исследованных образцах проб содержимого рубца доминировали 3 группы нежелательных микроорганизмов: эризипелотрикссы, фузобактерии и стрептококки. Эризипелотрикссы (в т.ч., *Bulleidia extracta*) – вид, среди которого нередко встречаются патогены, общие для человека и животных. Суммарная процентная доля их в образцах колебалась от 0,01 до 0,24 %. Данные организмы способны вызывать острые инфекционные заболевания, в образце №1 обнаружен

Erysipelothrix rhusiopathiae - возбудитель острых поражений кожи. Трепонемы – патогенные микроорганизмы, возбудители ряда инфекционных заболеваний человека и животных, включая межпальцевый дерматит жвачных. Суммарная процентная доля их в образцах колебалась от 0,015 до 0,17 %. Моракселлы – участники гнойно-воспалительных процессов в организме животных, вызывают повреждения слизистых покровов. Процентная доля их в образцах достигала 0,17 %. Данный факт еще раз подтверждает, что диареи нередко протекают в виде смешанных инфекций. Фузобактерии связаны с возникновением ламинитов и эндометритов у коров. Интересно, что возникновение послеотельных эндометритов у коров нередко имеет связь с кормлением и составом микробиома рубца (Iyldyrym et al., 2023).

Патогенные клостридии были представлены видами *Clostridium septicum* и *C. novyi*. Суммарное процентное количество патогенных клостридий в отдельных пробах рубцового содержимого не превышало 0,54 % и также отличалось большим разбросом между пробами (так, в пробах №1 и №3 было обнаружено их содержание менее 0,05 %).

Суммарная доля лактобацилл в исследованных образцах колебалась от 1,12 до 0,2 %. Наибольшее количество было обнаружено в пробах №2 и №5. Лактобактерии в рубце ферментируют моносахара до молочной кислоты и могут приводить к снижению pH.

Заключение. Микробные популяции, сформировавшиеся в раннем возрасте, могут влиять на здоровье и продуктивность взрослого животного, что указывает на потенциал программирования микробиома рубца уже с рождения. Нами показано, что диареи у телят нередко протекают в виде смешанных инфекций на фоне дисбиоза нормобиоты, что свидетельствует о необходимости внимательного подхода к выбору антибиотиков для лечения, а также необходимости профилактики микробиома пищеварительной системы коров с помощью пробиотиков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №24-16-00131 «Разработка нового биотехнологического подхода к профилактике и лечению эндометрита у коров».

Литература. 1. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency / L. L. Guan, J. D. Nkrumah, J. A. Basarab, S. S. Moore // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – V. 288. - p. 85–91. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01343.x. 2. Calf rumen microbiome from birth to weaning and shared microbial properties to the maternal rumen microbiome / K. L. Woodruff [et al.] // *J. Anim. Sci.* – 2022. - V. 1. - № 100 (10) : skac264. doi: 10.1093/jas/skac264. PMID: 35986918; PMCID: PMC9576027. 3. Composition and functions of rumen and endometrial microorganisms associated with endometritis in dairy cows / E. A. Iyldyrym [et al.] // *BIO Web of Conferences. The 2nd International Conference «Sport and Healthy Lifestyle Culture in the XXI Century» (SPORT LIFE XXI). S. Eliseeva and E.A. Vatskel (Eds.). - 2023. - C. 03008.*