

УДК.: 639.371.2/7:636.5.033:639.122:612.336.3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КИШЕЧНЫХ МИКРОБИОМОВ РЫБ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП И ДВУХ ВИДОВ КУРИНЫХ ПТИЦ

Скворцова Елена Гамеровна (0000-0003-0699-7959),
Филинская Оксана Владимировна (0000-0003-3981-3546)

ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА, Ярославль, Россия

Аннотация: В статье представлена информация о доминирующих типах бактерий в кишечной микробиоте двух видов рыб (стерляди *Acipenser ruthenus* и африканского сома *Clarias gariepinus*) и двух видов птиц (цыплят-бройлеров кросса Росс 308 и тexasских белых перепелов). ДНК выделяли из толстого отдела кишечника рыб и из помёта птиц. Для изучения метагенома использовали секвенирование нового поколения (NGS) на платформе Illumina: MiSeq, длина чтений два по двести пятьдесят пар оснований, набор V2 Nano. Установлено, что в бактериальном сообществе кишечника рыб доминируют представители типов Firmicutes, Proteobacteria и Fusobacteria, тогда как в кишечной микробиоте птиц наблюдается значительное превосходство одного типа микроорганизмов – Firmicutes. У рыб следующим типом по представленности является Fusobacteria, тогда как у цыплят-бройлеров и перепелов их менее 1%. Представители типа Actinobacteria содержатся в достаточно большом количестве у сомов и перепелов. Также выделены представители минорных типов: Tenericutes у стерляди, Verrucomicrobia, Spirochaetes, Thermi, Chlorobi и Gemmatimonadetes – у сомов, Synergistetes – у цыплят-бройлеров, у Chloroflexi, Cyanobacteria и Thermotogae – у перепелов.

Ключевые слова: кишечная микробиота, стерлядь, сомы, цыплята-бройлеры, перепела, метагеномный анализ

БАЛЫКТАРДЫН ТАКСОНОМИЯЛЫК ТОПТОРУНУН ЖАНА ТООК КАНАТТАРЫНЫН ЭКИ ТУРКУНУН ИЧЕГИ МИКРОБИОМУНУН САЛЫШТЫРУУ ТАЛЛИЗИ

Скворцова Елена Гамеровна (0000-0003-0699-7959),
Филинская Оксана Владимировна (0000-0003-3981-3546)

ФГБОУ ВО Ярославлдагы мамлекеттик айыл чарба академиясы, Ярославль, Россия

Аннотация: Макалада балыктын эки түрүнүн (sterlet *Acipenser ruthenus* жана африкалык сом балыгы *Clarias gariepinus*) жана канаттуулардын эки түрүнүн (Ross 308 крестинин бройлер тооктары жана Texas ак бөдөнөлөрү) ичеги микробиотасындагы бактериялардын басымдуу түрлөрү жөнүндө маалымат берилген. ДНК балыктын жана канаттуулардын кыктарынын жоон ичегисинен бөлүнүп алынган. Метагеномду изилдөө үчүн Illumina платформасында жаңы муундун ырааттуулугу (NGS) колдонулган: MiSeq, эки жүз элүү bp окуу, V2 Nano комплект. Балык ичегисинин бактериялык коомчулугунда Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria типтеринин өкүлдөрү үстөмдүк кылаары аныкталган, ал эми канаттуулардын ичеги микробиотасында микроорганизмдердин бир түрү Firmicutes олуттуу басымдуулук кылат. Балыкта фузобактериялар көп, ал эми бройлер тооктарында жана бөдөнөлөрүндө 1% дан азыраак. Актинобактериялар

түрүнүн өкүлдөрү сом балыктарда жана бөдөнөлөрдөн кыйла көп кездешет. Майда типтердин өкүлдөрү да аныкталган: стерлетте тенеракуттар, веррукомикробияларда, спирохеттерде, термиде, хлоробиде жана гемматимонадеттерде, бройлер тооктарында синергеттиктерде, бөдөнөдө хлорофлексиде, цианобактерияларда жана термотогаларда.

Өзөктүү сөздөр: ичеги микробиотасы, стерлет, сом, бройлер тооктары, бөдөнө, метагеномикалык анализ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INTESTINAL MICROBIOMES OF FISH TAXONOMICAL GROUPS AND TWO SPECIES OF CHICKEN BIRDS

Skvortsova Elena Gamerovna (0000-0003-0699-7959),
Filinskaya Oksana Vladimirovna (0000-0003-3981-3546)

State Agricultural Academy (FSBEI HE Yaroslavl SAA), Yaroslavl, Russia

Annotation: The article provides information on the dominant types of bacteria in the intestinal microbiota of two fish species (sterlet *Acipenser ruthenus* and African catfish *Clarias gariepinus*) and two bird species (broiler chickens of the Ross 308 cross and Texas white quails). DNA was isolated from the large intestine of fish and bird droppings. To study the metagenome, new generation sequencing (NGS) was used on the Illumina platform: MiSeq, two hundred and fifty bp reads, V2 Nano kit. It has been established that representatives of the Firmicutes, Proteobacteria, and Fusobacteria types dominate in the bacterial community of the fish intestine, while in the intestinal microbiota of birds, a significant predominance of one type of microorganisms, Firmicutes, is observed. In fish, Fusobacteria is the next type in abundance, while in broiler chickens and quails it is less than 1%. Representatives of the Actinobacteria type are found in fairly large numbers in catfish and quails. Representatives of minor types are also identified: Tenericutes in sterlet, Verrucomicrobia, Spirochaetes, Thermi, Chlorobi and Gemmatimonadetes in catfish, Synergistetes in broiler chickens, in Chloroflexi, Cyanobacteria and Thermotogae in quails.

Keyword: intestinal microbiota, sterlet, catfish, broiler chickens, quail, metagenomic analysis

1. Введение

Прошло уже пять лет с появления статьи международного коллектива авторов «Как мы можем определить «оптимальную микробиоту?»: сравнительный обзор структуры и функций микробиоты животных, рыб и растений в сельском хозяйстве», посвящённой проблемам, возникающим при метагеномном анализе микробиоты сельскохозяйственных растений, почвы и животных. Авторами были подняты интересные вопросы: 1) как изменения в микробиоте объясняют эффективность таких методов лечения, как смена корма, изменение удобрения или нокаут генов в организмах-хозяевах?;

2) что делать, если не наблюдается явных изменений в микробной структуре, соответствующих конкретному лечению?; 3) как использовать микробные данные для улучшения факторов хозяина, если отсутствуют определения и критерии «оптимальной микробиоты» у животных, рыб и растений? [7]. С тех пор интерес к метагеномным исследованиям не угас, всё новые и новые коллективы ученых вносят свой вклад в накопление данных по составу микробных сообществ различных сельскохозяйственных, природных и лабораторных организмов [5,6], но вопросы пока не решены. Также большое количество исследований

посвящено исследованию различных пробиотических препаратов на здоровье рыб, птиц, млекопитающих и др. [1-4]. И тоже нет однозначного ответа на вопрос, насколько необходимо их использование, сколько пользы они приносят, достаточно ли их применения для полной замены антибиотикам, какие препараты лучше выбрать в каждом конкретном случае и т.п. С одной стороны, животные миллионы лет жили без применения пробиотических препаратов, часто успешно оставляя потомство. С другой стороны, интенсификация сельскохозяйственного производства, скученность организмов, их интенсивное использование в корне поменяли стратегию, и макроорганизмам уже жизненно необходима поддержка извне. И тут появляется ещё один вопрос: все ли микроорганизмы, включаемые в качестве добавок в рацион животных, приживутся в их пищеварительном тракте? Ведь давно известно, что хотя бактерии повсеместно распространены во всех жизнеобеспечивающих средах на Земле, в

разных типах среды обитают поразительно разные бактериальные сообщества [9]. Симбиотические микроорганизмы могут образовывать как облигатные, так и факультативные кишечные сообщества. В кишечнике позвоночных бактерии играют важную физиологическую роль, влияя на метаболические процессы, такие как переваривание сложных углеводов и регуляцию накопления жира. Таким образом, метагеномные исследования микроорганизмов кишечника рыб, птиц и других животных продолжают быть крайне актуальными. Поэтому целью данной работы явился сравнительный анализ кишечных микробиомов (на уровне типов) рыб разных таксономических групп (стерляди и африканского сома), и двух видов куриных птиц, содержащихся в неволе (техасского белого перепела и цыплят-бройлеров кросса Росс-308). В дальнейшем планируется провести биоинформатический анализ (кластеризация, таксономическая классификация OTU и визуализация

Таблица 1. Представленность доминирующих типов кишечной микробиоты рыб.

| Тип микроорганизмов | Доля от общего количества прочтений в кишечнике | Доля от общего количества прочтений в |
|------------------------------|---|---------------------------------------|
| | стерляди | кишечнике сомов |
| Firmicutes | 29,88±9,43 | 17,56±2,90 |
| Proteobacteria | 26,89±11,40 | 44,89±6,73 |
| Fusobacteria | 25,15±18,28 | 10,99±6,56 |
| Сyanobacteria | 9,89±5,58 | 0,46±0,20 |
| Actinobacteria | 3,65±1,59 | 13,50±2,21 |
| Unclassified at Phylum level | 2,25±0,60 | 9,09±3,53 |
| Bacteroidetes | 1,45±1,33 | 1,94±0,32 |
| Planctomycetes | 0,20±0,17 | 0,21±0,12 |
| Tenericutes | 0,11±0,12 | – |
| Synergistetes | 0,05±0,06 | 0,06±0,06 |
| Verrucomicrobia | – | 0,39±0,17 |
| Spirochaetes | – | 0,25±0,26 |
| Thermi | – | 0,08±0,08 |
| Chlorobi | – | 0,03±0,03 |
| Gemmatimonadetes | – | 0,02±0,02 |

В таблице 2 представлены результаты метагеномного анализа кишечной микробиоты птиц (цыплят-бройлеров и техасских белых перепелов).

Таблица 2. Представленность доминирующих типов кишечной микробиоты птиц.

| Тип микроорганизмов | Доля от общего количества прочтений | Доля от общего количества прочтений |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | в кишечнике бройлеров | в кишечнике перепелов |
| Firmicutes | 92,93±0,29 | 57,59±5,80 |
| Unclassified at Phylum level | 3,69±0,32 | 1,15±0,30 |
| Proteobacteria | 1,74±0,06 | 22,57±6,36 |
| Tenericutes | 0,41±0,03 | 0,01±0,01 |
| Actinobacteria | 0,38±0,02 | 13,50±5,15 |
| Nitrospirae | 0,21±0,03 | – |
| Bacteroidetes | 0,17±0,01 | 4,29±2,33 |
| Fusobacteria | 0,03±0,02 | 0,56±0,27 |
| Synergistetes | 0,14±0,04 | – |
| Chloroflexi | – | 0,02±0,02 |
| Cyanobacteria | – | 0,24±0,15 |
| Thermotogae | – | 0,01±0,01 |

Источник: Составлено авторами.

разнообразия).

2. Материалы и методы исследования

Для сравнения были использованы данные метагеномного анализа, полученные с помощью технологии NGS-секвенирования, кишечника рыб: стерлядь *Acipenser ruthenus* (n=4, средняя масса 305,5±27,47 г), африканский сом *Clarias gariepinus* (n=10, средняя масса 85,3±4,88 г), а также помёта птиц: белый техасский перепел (n=5, средняя масса 324,8±10,64 г), цыплята-бройлеры кросса Росс-308 (n=3, средняя масса 1987±59,4 г). Рыбы содержались в заводских бассейновых условиях с УЗВ, птицы – в клетках в личных подсобных хозяйствах. ДНК выделяли готовыми наборами для выделения геномной ДНК из клеток и тканей (ООО «Синтол»). Выделенную ДНК проверяли на чистоту с помощью спектрофотометра BioSpectrometer производства компании Eppendorf. Амплификация переменных регионов V3-V4 гена 16S рРНК проводилась с использованием универсальных праймеров.

3. Результаты исследования

Проведённые исследования показали, что в бактериальном сообществе кишечника рыб доминируют представители типов Firmicutes, Proteobacteria и Fusobacteria, причем у стерляди данные типы представлены приблизительно в равных долях (по 25-30%), а в кишечнике сомов протеобактерий значительно больше (почти 45%), чем фирмикут и фузобактерий (таблица 1). Следующими по представленности являются типы Cyanobacteria (в большом количестве содержатся только у стерляди), Actinobacteria и Bacteroidetes (как у стерляди, так и у сомов). Доля неидентифицированных сиквенсов невелика: 2,25% в кишечном микробиоме *Acipenser ruthenus*; 9,09% – *Clarias gariepinus*. Из минорных типов, содержание которых не превышает одного процента, для двух исследованных видов рыб совпадают только микроорганизмы типов Planctomycetes и Synergistetes. Бактерии типа Tenericutes представлены только у стерляди, Verrucomicrobia, Spirochaetes,

Thermi, Chlorobi и Gemmatimonadetes – у сомов.

В кишечной микробиоте птиц наблюдается значительное превосходство одного типа микроорганизмов – Firmicutes. В помёте бройлеров их содержится почти 93%, в помёте перепелов – 58%. У цыплят кросса Росс 308 можно выделить ещё только один тип, содержание которого превышает 1%, но незначительное – Proteobacteria (1,7%). У перепелов этот тип находится на втором месте, но их значительно больше – 22,6%. Также у этих птиц присутствуют в значительном количестве бактерии типа Actinobacteria (13,5%) и Bacteroidetes (4,3%). Из минорных типов общим является Fusobacteria, исключительно «куриным» Synergistetes; «перепелиными» – Chloroflexi, Cyanobacteria и Thermotogae.

4. Дискуссия

Согласно исследованиям международного коллектива авторов, микробиота животных и рыб очень разнообразна и может содержать до 20 типов бактерий, но общей чертой является то, что три типа: Proteobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes доминируют в бактериальном сообществе, при этом фузобактерии могут представлять собой основную бактериальную группу «основного микробиома кишечника» некоторых морских и пресноводных рыб [7]. Наше исследование подтверждает информацию о преобладании типов Firmicutes и Proteobacteria. Что касается представителей типа Bacteroidetes, то у рыб и перепелов они содержатся в небольшом, но не минорном количестве (1,5-4,3%), а у цыплят-бройлеров их менее 1% (0,2%). Фузобактерии у рыб также представлены в значительном количестве. Кишечная микробиота цыплят-бройлеров отличается самым низким биоразнообразием из всех изученных биоценозов, что подтверждает информацию Зигерштеттера и соавторов [8] о большем микробном богатстве у птиц, которых кормили ограниченно.

5. Выводы

Таким образом, для исследованных

видов рыб и птиц общими являются бактерии типов Firmicutes и Proteobacteria, но представителей первого типа (Firmicutes) в кишечной микробиоте птиц больше. У рыб следующим типом по представленности является Fusobacteria, тогда как у цыплят-бройлеров и перепелов данный тип является минорным (содержится менее 1%). Представители типа Actinobacteria содержатся в достаточно большом количестве у сомов и перепелов (по 13,5%).

6. Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научно-исследовательской работы №123041800021-8

7. Использованная литература

1. Влияние пробиотика "Яросил" на активность пищеварительных ферментов в кишечнике цыплят / И. Л. Голованова, А. А. Филиппов, Е. А. Куливацкая, Е. Г. Скворцова // Вестник АПК Верхневолжья. 2022. № 1(57). С. 42-47. doi: 10.35694/YARCX.2022.57.1.007.
2. Влияние пробиотиков на активность пищеварительных ферментов в кишечнике у цыплят при разных значениях pH / И. Л. Голованова, А. А. Филиппов, Е. А. Куливацкая, Е. Г. Скворцова // Проблемы биологии продуктивных животных. 2023. № 1. С. 56-62. doi: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2023.1.56-62.
3. Влияние кормового пробиотика на основе бактерий *Bacillus subtilis* на пищеварение рыб при садковом выращивании / В. А. Зуенко, К. С. Лактионов, И. В. Правдин, Л. З. Кравцова, Н. А. Ушакова // Вопросы ихтиологии. 2017. Т. 57. № 1. С. 112-117.
4. Зуенко, В. А. Повышение продуктивности рыбоводческих хозяйств за счет использования биологически активных кормовых добавок (на примере использования пробиотика на основе бактерий *Bacillus subtilis* при выращивании карпа и стерляди в садковых

хозяйствах Орловской области) / В. А. Зуенко // Достижения вузовской науки 2018: сборник статей II Международного научно-исследовательского конкурса: в 2 ч., Пенза, 05 мая 2018 года. Том Часть 1. – Пенза: «Наука и Просвещение» (ИП Гуляев Г.Ю.). 2018. С. 28-35.

5. Сергалиев, Н. Х. Структура микробиома в установках замкнутого водоснабжения и их связь с возникновением инфекционной патологии осетровых рыб / Н. Х. Сергалиев, М. Г. Какишев, И. Н. Залялов, Н. С. Гинятов, Ф. Х. Нуржанова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т. 243. № 3. С. 237-244.

6. Фисинин В.И., Лукашенко В.С., Салеева И.П., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Волик В.Г., Исмаилова Д.Ю. Микрофлора желудочно-кишечного тракта и продуктивность цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) под влиянием кормовых добавок из гидролизатов кератин- и коллагенсодержащего сырья //

Сельскохозяйственная биология. 2019. №2. С. 291-303.

7. Ikeda-Ohtsubo W., Brugman S., Warden C. H. [et al.] How Can We Define "Optimal Microbiota?": A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture // *Front Nutr.* 2018. № 5:90. P. 1–18. doi: 10.3389/fnut.2018.00090.

8. Siegerstetter S.-C., Petri R.M., Magowan E., Lawlor P.G., Zebeli Q., O'Connell N.E., Metzler-Zebeli B.U. Feed restriction modulates the fecal microbiota composition, nutrient retention, and feed efficiency in chickens divergent in residual feed intake. *Front. Microbiol.* 2018; 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02698.

9. Sullam, K. E. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis / K. E. Sullam, S. D. Essinger, C. A. Lozupone, M. P. O'Connor, G. L. Rosen, R. Knight, S. S. Kilham, J. A. Russell // *MolEcol.* 2012. № 21(13). P. 3363-3378. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x.