

Анализ структуры бактериального сообщества в рубцовом содержимом овец с применением метода NGS- секвенирования.

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии,
биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный
центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».*

Боровск, Калужская обл., РФ

Колоскова Е.М.

Рубец – главный пищеварительный орган жвачных животных

Обладает большим объемом и большой ферментативной ёмкостью.

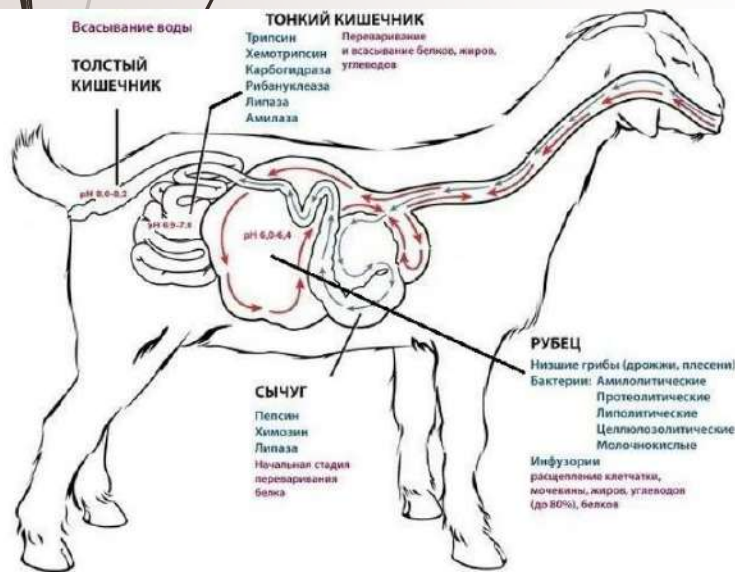
В ферментация корма участвуют сотни видов специфичных анаэробных микроорганизмов.

Большинство протеина и энергии для жизнедеятельности жвачных животных производят микробные популяции рубца: это микробная экосистема, существующая в динамическом балансе.

Микрофлора рубца динамична и постоянно меняется параллельно изменениям в кормлении, условиям содержания, с возрастом животных, при стрессах.

Рубцовая среда может изменить состав и микробную активность с его физико-химическими параметрами.

У всех жвачных животных индивидуальный микробный баланс рубца



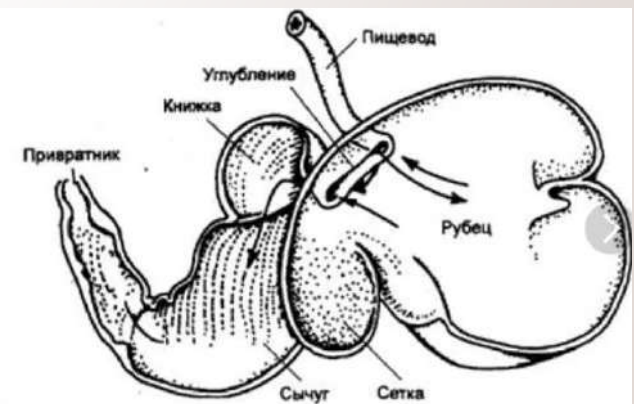
В одном миллилитре содержимого рубца овцы содержится:

1.61×10^{10} бактерий

10^6 жгутиковых

3.3×10^5 инфузорий

объем желудка овцы 6 литров



Типы микробиоты рубца

Бактерии: около 100 видов, большинство - некультивируемые; общая бактериальная масса рубца составляет около 10% его содержимого;

Простейшие (инфузории): встречается до 120 видов инфузорий: у овец - до 30 видов.

Низшие грибы (дрожжи, плесени): описано 23 вида грибов.

Основные микроорганизмы рубца - функции

Бактерии:

целлюлозолитические - расщепляют клетчатку до ди- и моносахаридов;

амилолитические - расщепляют крахмал и мальтозу до янтарной, уксусной и муравьиной кислот);

молочнокислые - сбраживают простые углеводы (глюкозу, лактозу, мальтозу) сахарозу до молочной кислоты;

протеолитические - расщепляют белки последовательно до пептидов, аминокислот, аммиака;

липолитические расщепляют жиры до глицерина и жирных кислот.

Инфузории: обладают протеолитической и целлюлозолитической способностью, липидосинтезирующей функцией, сбраживают углеводы; они подвергают корм механической обработке, используют для своего питания клетчатку. Инфузории размельчают, разрыхляют корм, он становится более доступным для действия бактериальных ферментов).

Грибы: обладают целлюлозолитической активностью, участвуют в синтезе аминокислот и гликогена, синтезе липидов, сбраживают простые сахара, вырабатывают антибиотики).

Сообщество микроорганизмов (**микробиота**), населяющих рубец жвачных животных, - это огромное количество постоянно взаимодействующих между собой видов. От состояния микробиоты рубца зависит эффективность переваривания кормов, формирование иммунитета, уровень продуктивности и здоровье животных.

Совокупность генетического материала **микробиоты**, населяющей какую-либо нишу организма, определяется как **микробиом**.

В 1 мл рубцовой жидкости содержится около тысячи видов бактерий, по сотне видов грибов, архей и простейших. Их взаимодействие и совместное обитание в этой многокомпонентной системе связано с многообразием источников растительной клетчатки и разнообразием спектра продуцируемых микроорганизмами ферментов.

Метагеномика - раздел молекулярной генетики, который изучает набор генов всех микроорганизмов, находящихся в образце среды – метабеноме (микробиоме).

Метагеномный анализ позволяет определить видовое разнообразие исследуемого образца без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов.

*В отечественной научной литературе термины **микробиом**, **микробиота** и **микрофлора** используются как синонимы.*

Функции микробиоты:

- пищеварительная функция: входит в состав пищевых цепей, приводящих к расщеплению сложных целлюлозосодержащих биополимеров до легкого усвояемых хозяином мономеров; участвует в метаболизме, синтезе витаминов,
- обеспечивает непрерывность и термодинамическую выгодность пищеварительных процессов в условиях ЖКТ;
- иммунная функция: активация и развитие врожденных и адаптивных иммунных реакций хозяина,
- защита хозяина от патогенных микроорганизмов
- психическая функция: регуляция ряда аспектов поведения хозяина, управление стрессом, влияние на когнитивные функции посредством выделения ряда нейромедиаторов.

Микробиота - важное звено в **системе адаптации**, в том числе, при **стрессах** различного происхождения. Воздействие стрессора вызывает существенные изменения в сообществе микроорганизмов.

Разработка профилактических и терапевтических стратегий сохранения и улучшения функций микробиоты – одна из задач исследований.

Основные направления коррекции кишечной микробиоты:

- Модификации рационов;
- Использование пробиотиков и пребиотиков, в том числе - «психобиотиков».

«Психобиотики» – общее название пребиотиков и пробиотиков, направленных на терапию психических отклонений

Цель исследований:

- получить информацию о составе микробиоты рубца овец-ярок романовской породы, находившихся на содержании в условиях вивария;
- выяснить влияние адаптогена аскорбата лития на качественный и количественный состав микробиоты рубца овец с использованием метода NGS.

Длительность эксперимента – 60 суток

Группа	Голов в группе	Характеристика кормления
Контрольная	8	Основной рацион (ОР)
Опытная	8	ОР +10 мг LiAsc на кг живой массы

Выделение ДНК из рубцового содержимого



NGS секвенирование



Анализ данных

Метагеномное секвенирование выполнено
в ООО «Биотроф» на геномном
секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США)



БИОТРОФ
микробиология для животноводства

Аскорбат лития – органическая соль лития, где в одной молекуле содержатся два активных действующих вещества – аскорбиновая кислота и литий – обладающие синергетическим эффектом. Безопасен, эффективен в низких дозах и обладает широким спектром активности, несвойственным другим солям лития.

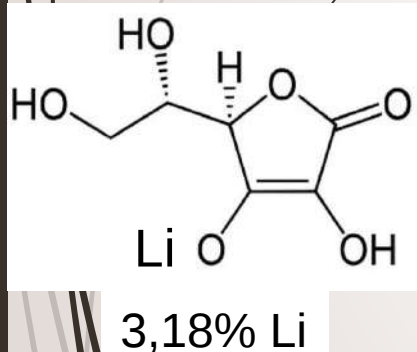
Литий – важнейший микроэлемент для правильного функционирования ряда ферментов, гормонов, витаминов, факторов роста, иммунной и нервной систем.

Аскорбиновая кислота необходима для нормального функционирования соединительной и костной ткани. Выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов. Антиоксидант.

Основной рацион: концентрат – 500 г, сено разнотравное 1,5 кг

Состав гранулированного комбикорма-концентрата

«Комбикорм для коз и овец КК-85 (МРС)»



Состав рецепта		Дополнительно введено витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма	
Наименование	%	Наименование, ед.изм	значение
Овес	15,0	Fe, мг	25,0
Ячмень	46,0	Cu, мг	2,5
Масло подсолнечное	1,0	Zn, мг	30,0
Отруби пшеничные	16,0	Mn, мг	40,0
Шрот подсолн., СП36%, СК 19	15,5	Co, мг	1,0
Травяная мука	5,5	I, мг	1,0
Дефторированный фосфат	2,0	Se, мг	0,15
Известняковая мука	3,0	Витамин А, тыс.МЕ	10,0
Премикс	0,5	Витамин D3, тыс.МЕ	1,0
Соль поваренная	1,0	Витамин Е, мг	10,0
		S	100,0

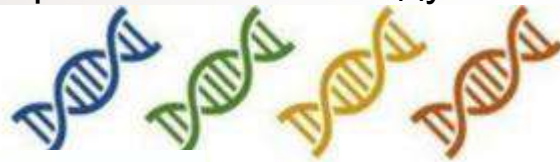
Методология.

NGS (next generation sequencing) — секвенирование нового поколения: определение нуклеотидной последовательности ДНК или РНК.

Принцип технологии NGS основан на массовом одновременном секвенировании тысяч фрагментов ДНК на базе подготовленных одноцепочечных библиотек.

Методы позволяют выполнять одновременное считывание миллиардов коротких фрагментов нуклеиновых кислот.

Метагеномное секвенирование позволяет определить состав микроорганизмов в исследуемом образце, например, в рубцовом содержимом.



Мишень: ген 16S рРНК

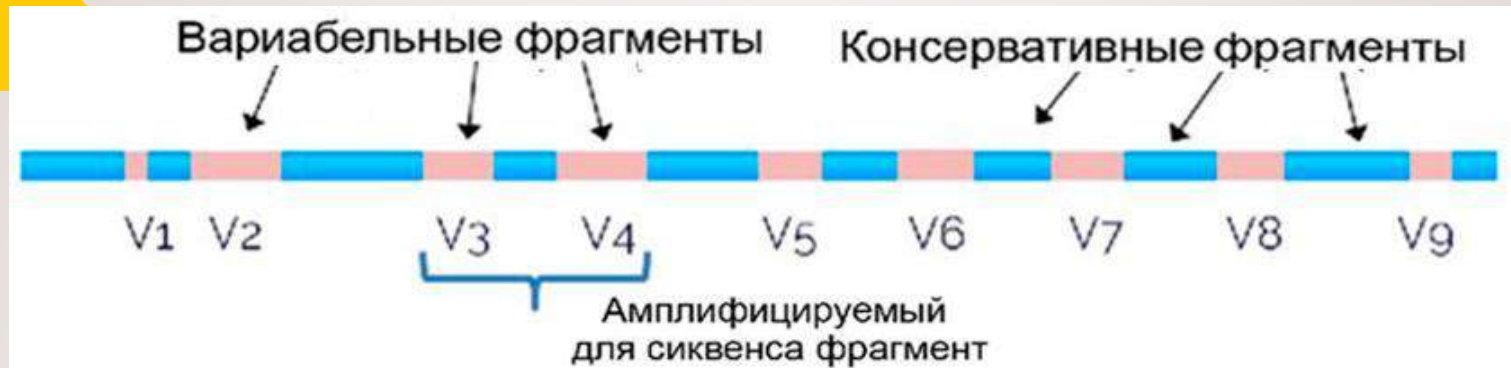
16S рРНК — один из трёх основных типов рРНК, образующих основу рибосом прокариот.

Последовательность гена 16S рРНК используется в исследовании филогенетики бактерий и архей, применяется для медицинских исследований патогенных бактерий.

С 2010 года был запущен проект «**Микробиом Земли**», объединяющий исследования по этой теме.



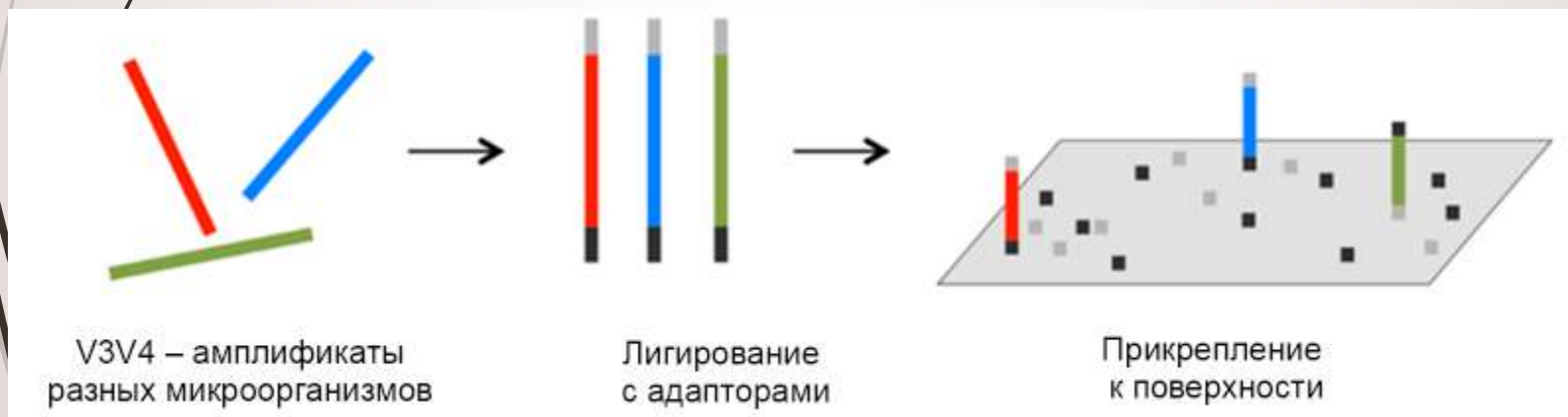
Первичная структура гена 16S рРНК



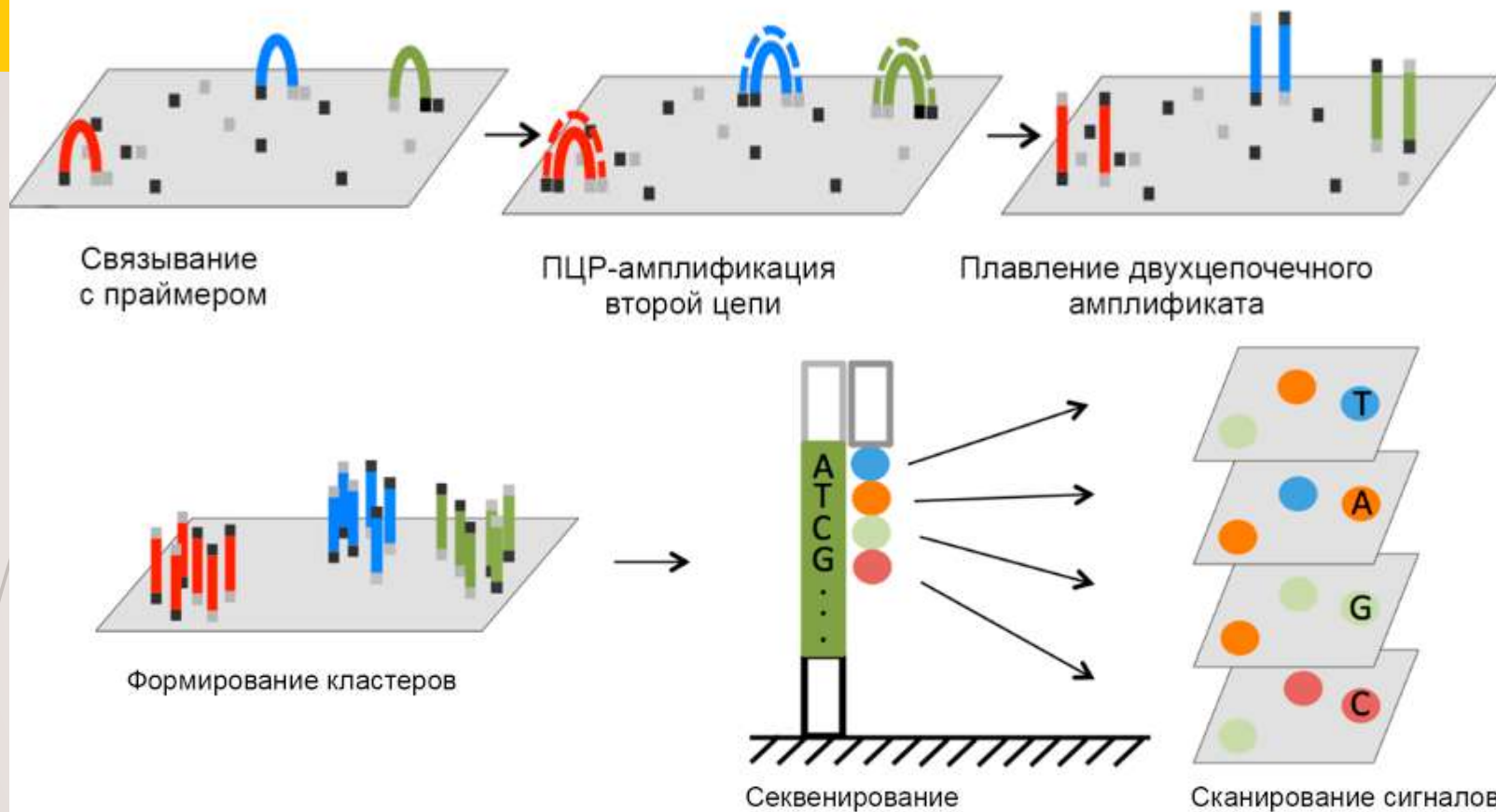
ПЦР с праймерами к консервативным фрагментам.

Результат: V3V4 - амплификаты размером около 460 п.н.

Принцип метода NGS-секвенирования



Принцип метода NGS-секвенирования (продолжение)



Использование программ:
«USEARCH 7.0» (<http://drive5.com/usearch/>);
платформа «CLC Bio GW 7.0» («Qiagen», Нидерланды);
Определение таксономической принадлежности
микроорганизмов до рода:
RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).



Анализ данных

Таксономическая иерархия микроорганизмов рубца овец на основе результатов NGS секвенирования

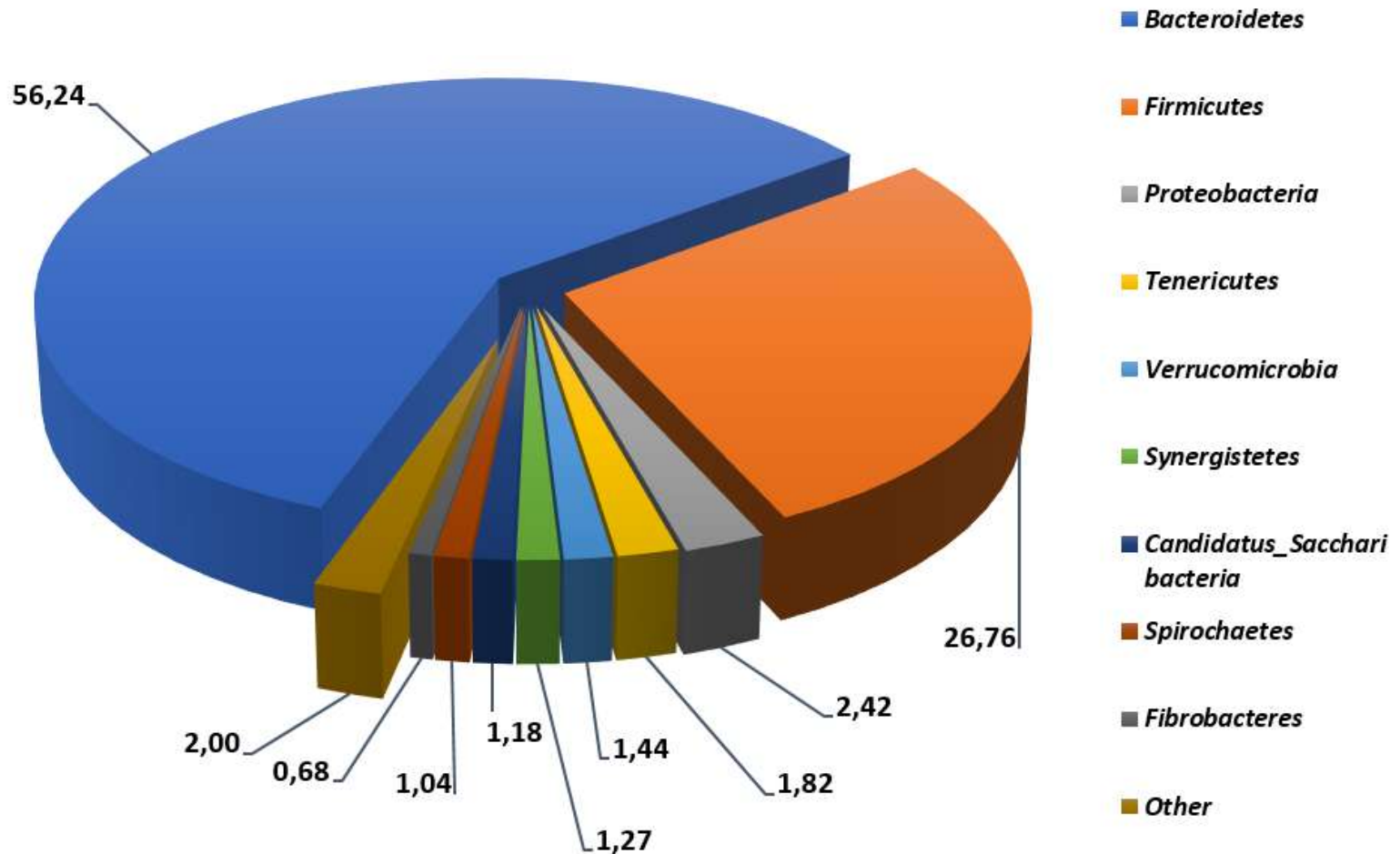
Домен « Bacteria » (эубактерии)	Домен « Archaea » (архебактерии)
1) бактерии с тонкой клеточной стенкой, грамотрицательные 2) бактерии с толстой клеточной стенкой, грамположительные 3) бактерии без клеточной стенки (класс Mollicutes — микоплазмы)	Архебактерии не содержат пептидогликан в клеточной стенке. Они имеют особые рибосомы и рибосомные РНК (рРНК). Среди них нет возбудителей инфекций

Доля бактерий и архей в рубцовом содержимом овец контрольной и опытной групп (% от суммарного количества микроорганизмов)

Домен	$M \pm m$
Bacteria	$95,66 \pm 0,52$
Archaea	$0,18 \pm 0,05$

Микробиоту рубца овец представляют 37 **филумов** (типов, отделов) бактерий, из них 8 - с долей выше 1% от суммарного количества микроорганизмов.

Основные филумы - *Bacteroidetes* (53-60%) и *Firmicutes* (24-29%)



Bacteroidetes

Porphyromonas catoniae

Prevotella denticola

Bacteroides fragilis

Bacteroides caccae

Bacteroides eggerthii

Bacteroides vulgatus

Bacteroides uniformis

Firmicutes

Enterococcus faecalis

Enterococcus durans

Enterococcus faecium

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus

Lactobacillus reuteri

Lactobacillus fermentum

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus casei

Lactobacillus johnsonii

Lactobacillus intestinalis

Lactobacillus gasseri

Lactobacillus acidophilus

Lactococcus lactis

Streptococcus infantarius

Streptococcus thermophilus

Streptococcus mitis

Streptococcus anginosus

Филум **Bacteroidetes** —

тип грамотрицательных неспорообразующих анаэробных палочковидных бактерий, широко распространённых в окружающей среде, включая почву, ил, морскую воду, а также желудочно-кишечный тракт и кожу животных.

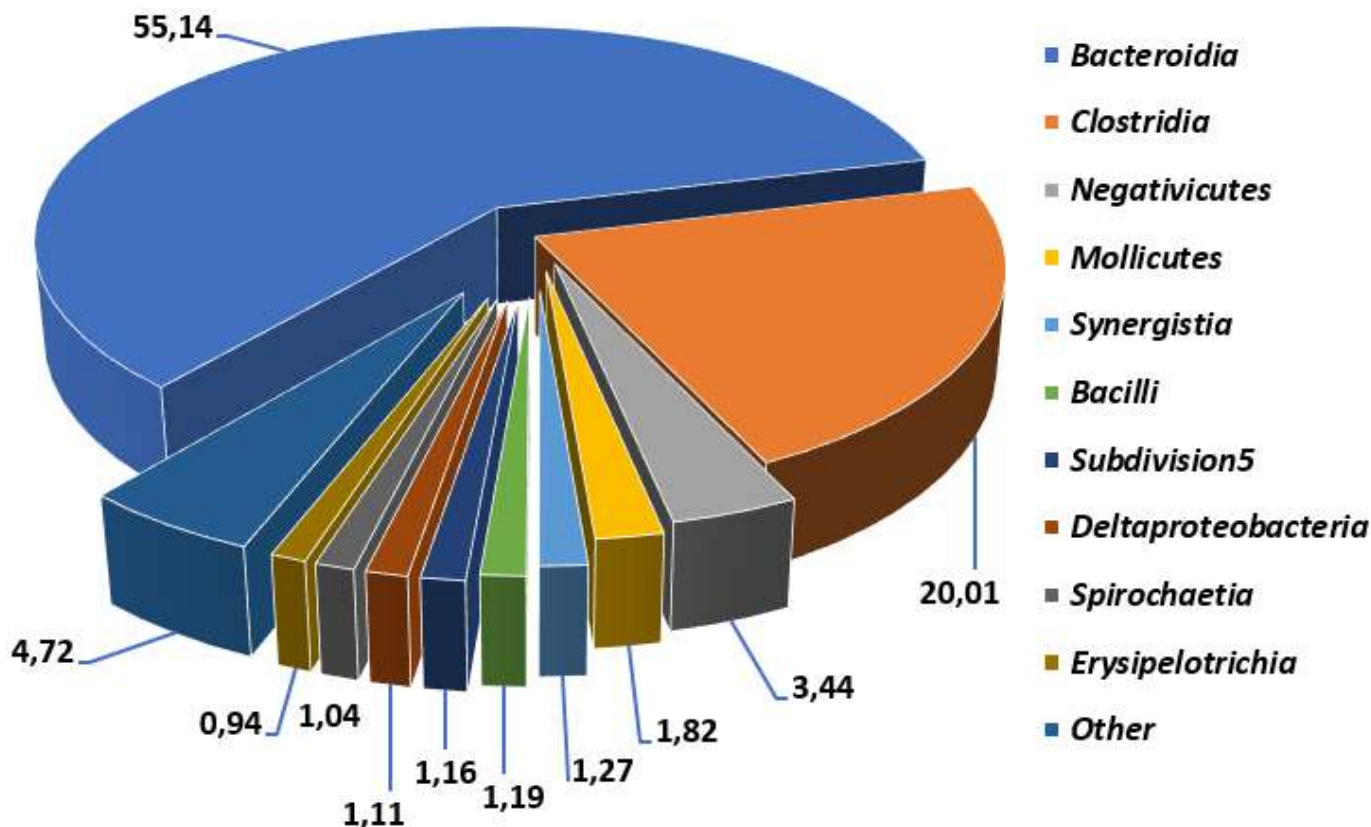
Включает классы: **Bacteroidia**, **Cytophagia**, **Flavobacteriia**, **Sphingobacteriia**

Филум **Firmicutes** —

тип бактерий, представители которого характеризуются низким содержанием пар нуклеотидов GC (меньше 50 %) и строением клеточной стенки, характерным для грамположительных бактерий.

Включает классы: **Bacilli**, **Clostridia**.

Микробиота рубца овец была представлена
- 76 **классами** бактерий (10 классов с долей выше 1%),



- 98 **порядками** (7 порядков - с долей выше 1%).
Основные: *Bacteroidales* – 55,14% и *Clostridiales* – 19,60%

Определено 225 семейств.

**Семейства микроорганизмов, представленные в рубце
овец с содержанием более 1%**

		Контроль		Опыт	
		М	± m	М	± m
1	<i>Prevotellaceae</i>	36,821	± 0,752	33,921	± 2,517
2	<i>Porphyromonadaceae</i>	11,965	± 1,198	13,007	± 0,447
3	<i>Ruminococcaceae</i>	11,965	± 0,717	11,886	± 1,255
4	<i>Lachnospiraceae</i>	4,373	± 0,266	3,861	± 0,186
5	<i>Veillonellaceae</i>	2,665	± 0,151	2,291	± 0,531
6	<i>Rikenellaceae</i>	1,656	± 0,254	2,625	± 0,429
7	<i>Prolixibacteraceae</i>	1,546	± 0,040	3,258	± 0,320
8	<i>Acidaminococcaceae</i>	1,352	± 0,021	1,230	± 0,468
9	<i>Spirochaetaceae</i>	1,280	± 0,221	0,857	± 0,078
10	<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,084	± 0,088	0,789	± 0,145
11	<i>Anaeroplasmataceae</i>	1,066	± 0,031	0,398	± 0,068
12	<i>Bacteroidaceae</i>	0,965	± 0,043	1,584	± 0,209

Определено **894** вида микроорганизмов,
большинство из которых некультивируемые

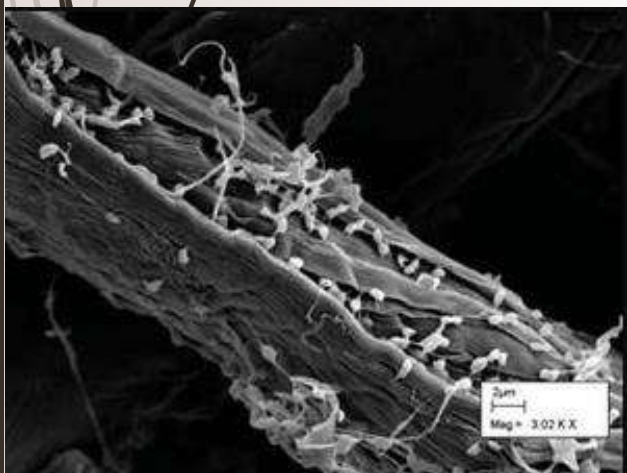
Целлюлозолитические бактерии рубца овец контрольной и опытной групп (% от общего количества бактерий)

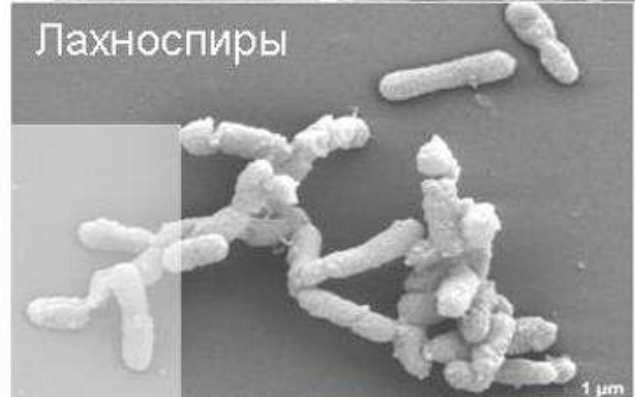
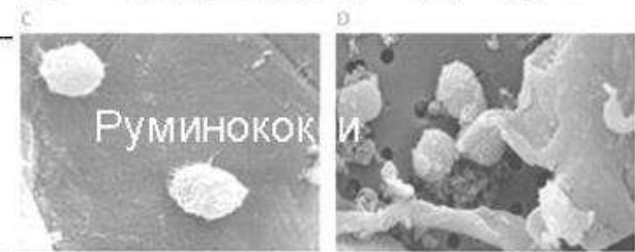
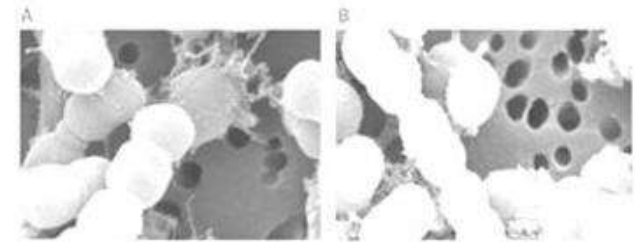
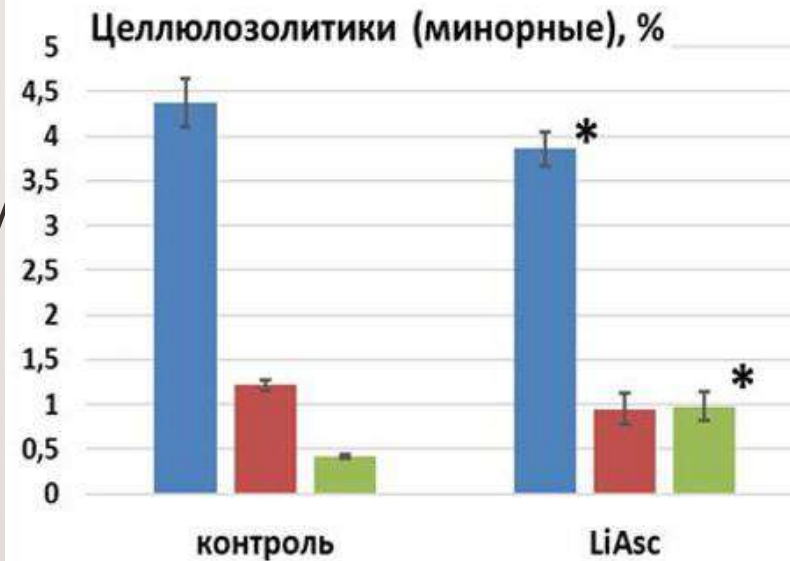
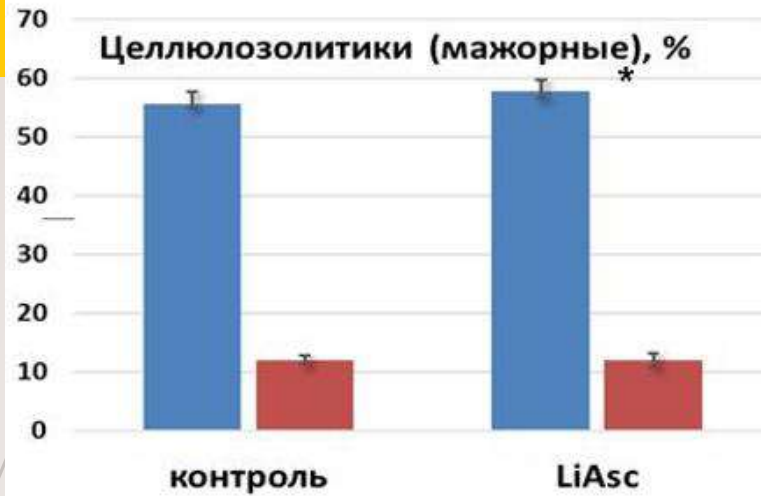
	Контроль		LiAsc	
	M	± m	M	± m
<i>Bacteroidetes</i>	55,63	± 2,02	57,69	± 1,89
<i>Ruminococcaceae</i>	11,96	± 0,72	11,89	± 1,25
<i>Lachnospiraceae</i>	4,37	± 0,27	3,86	± 0,19
<i>Clostridiaceae</i>	1,22	± 0,06	0,95	± 0,18
<i>Eubacteriaceae</i>	0,42	± 0,02	0,98	± 0,16
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0,02	± 0,00	0,04	± 0,02
<i>Thermoanaerobacterales</i>	0,02	± 0,01	0,01	± 0,00
Сумма целлюлозолитиков	73,64	± 1,62	75,42	± 0,94

Целлюлозолитическая активность* рубцового содержимого овец на фоне применения аскорбата лития (M±m)

Контроль	LiAsc
До исследования	
11,89±0,73	11,47±1,24
Через 60 суток	
11,82±0,51	16,31±1,52*

* Целлюлозолитическую активность содержимого рубца определяли по методу Долгова (1982 г.)





Заключение

Группы микроорганизмов, способствующих перевариванию и усвоению кормов (целлюлозолитические бактерии, лактат-ферментирующие бактерии, полезные бациллы) присутствовали в рубцовом содержимом овец в равномерных и высоких количествах.

Целлюлозолитические бактерии составляли не менее 70% от всех обнаруженных микроорганизмов.

Содержание целлюлозолитических бактерий и целлюлозолитическая активность были выше в рубцовом содержимом овец, получавших с кормом аскорбат лития в дозировке 10 мг/кг живой массы.

Полученные результаты дают основание сделать вывод о положительном влиянии аскорбата лития на качественный состав микробиоты рубца овец, и рекомендовать его применение в дополнение к основному рациону овец как при удовлетворительных условиях содержания, так и в условиях стресса.

Спасиђо за внимание!

