

УДК: 612.332.12:636.32/38.087.61:636.09

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.59

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА СОБАК, НАХОДЯЩИХСЯ НА СМЕШАННОМ ПИТАНИИ

Логинов С.Н.*¹ – асп. каф. специальных ветеринарных дисциплин (ORCID 0000-0002-4220-1009); Батомункуев А.С.¹ – д-р ветеринар. наук, доц., доц. кафедры специальных ветеринарных дисциплин (ORCID 0000-0002-2263-6355); Сухинин А.А.² – д-р биол. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии (ORCID 0000-0002-1245-3440); Краснопеов А.Ю.³ – науч. сотр. (ORCID 0000-0002-3368-4678); Горшкова А.С.³ – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0003-2408-0837); Белых О.И.³ – канд. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-1188-7351); Липко И.А.³ – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-6214-2974); Потапов С.А.³ – науч. сотр. (ORCID 0000-0003-1391-6731); Тихонова И.В.³ – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-4323-6799)

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского»

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

³ФГБУН «Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук»

*sergyn21@yandex.ru

Ключевые слова: собака; углеводная диета; микробиом кишечника; бактерии; метабаркодирование 16S рРНК

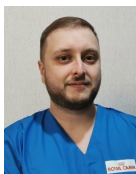
Key words: dog; hydrocarbon diet; intestine microbiome; bacteria; 16S rRNA metabarcoding

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 14.10.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Метабаркодинговые исследования кишечника домашних животных являются актуальными для ветеринарии. Влияние кормов и пищевых добавок на его микробиом кишечника имеет как прикладную, так и фундаментальную значимость и демонстрирует стимулирование роста различных групп бактерий. Целью нашей работы является изучение влияния отечественного полнорационного корма Дилли на микробное сообщество кишечника собак питомника г. Иркутска. Состав микробиома определяли у 12 животных разного возраста с помощью секвенирования ампликонов V3-V4 региона 16S рРНК на Illumina MiSeq. Коэффициенты разнообразия применяли для оценки богатства и представленности бактериальных ОТЕ, а непараметрический критерий Манна-Уитни (парный тест, $p \leq 0,05$) использовали для оценки достоверности разницы процентного содержания ОТЕ у различных физиологи-

ческих групп. Всего получено 147150 последовательностей фрагмента гена 16S рРНК. Доминирующими являлись бактерии филумов Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria. У исследуемых животных почти отсутствовали бактерии Fusobacteriota – маркеры диеты с преобладанием сырого мяса (хищничества). Филум Firmicutes включал бактерий пяти семейств. Самым многочисленным семейством среди фирмикут были бактерии Lactobacillaceae. Среди бактерий Actinobacteriota наблюдали представителей семи семейств, из которых доминировали Bifidobacteriaceae. Протеобактерии порядка Enterobacterales и Burkholderiales составляли малую долю от всего сообщества, и зависели от возраста животного. Результаты исследований в перспективе могут быть использованы для расширения знаний о процессе пищеварения у всеядного животного рода волков. У этих животных достаточно пластичный микробиом, который имеет несколько вариантов нормального состава. В микробных сообществах кишечника собак, потребляющих в пищу корма, содержащие грубые пищевые волокна, преобладали молочнокислые бактерии. В свою очередь, молочнокислые бактерии редуцировали численность Fusobacteriota.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Собака является первым одомашненным животным и до сих пор является важным спутником человека. Поведение, пищевые стратегии и рацион диких плотоядных животных, ставших домашними, претерпели значительные изменения. Известно, что состав микробиома кишечника в значительной мере определяется пищевыми предпочтениями и поступающей пищей. Животные семейства псовых имеют много особенностей пищеварения, так, у них очень простая и короткая пищеварительная система, которая должна эффективно разлагать пищу и быстро выводить ее из организма. Несмотря на поступление мясной пищи, они являются всеядными (омниворы), что обеспечивает разнообразие бактерий, участвующих в расщеплении пищи. Состав микробиома кишечника псовых зависит от генетических особенностей животного, условий содержания и кормления и является одним из самых разнообразных экотопов собаки [1, 2]. Одними из первых изучены культуры бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Pseudomonadaceae*, выделенные из кишечника собак [3]. Однако классические микробиологические методы недостаточны для оценки сложного бактериального разнообразия, обнаруженного в желудочно-кишечном тракте млекопитающих [4]. Первые данные о генетическом разнообразии кишечника собак получены с помощью молекулярно-

го клонирования фрагмента гена 16S РНК [5]. Однако появление технологии массового параллельного секвенирования полностью охарактеризовало это сообщество [6, 7, 8]. По данным зарубежных исследований породных животных и волков, основой микробного сообщества кишечника псовых являются Actinobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria [2]. Вариации состава микробиома зависят от возраста и сопутствующих болезней, приводящих к дисбиозу [9, 10, 11]. При дисбиозе увеличивается представленность условно-патогенных бактерий *Escherichia coli* и *Streptococcus*, и одновременно уменьшается доля представителей родов *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Blautia*, *Bacteroides*. Такие исследования способствовали разработке индекса дисбиоза на основе ПЦР в реальном времени. Он используется для ветеринарного контроля дисбаланса кишечника в зарубежной ветеринарной практике [12].

В России исследования кишечника собак проводятся в основном с помощью классических микробиологических методов [13, 14]. В отечественной литературе пока не практикуются молекулярно-биологические исследования бактериального состава кишечника собак, за исключением опубликованного эксперимента по влиянию кормовой добавки [15]. Цель нашей работы – исследовать состав микробиома кишечника собак иркутского

питомника с помощью высокопроизводительного секвенирования и выявить особенности микробиома с нарушением пищеварения, а также предоставить данные для последующего использования отечественными ветеринарными учреждениями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Для сравнения использовали генетический материал содержимого кишечника 12 беспородных животных из частного питомника-приюта. Животные не проявляли признаков истощения и заболеваний и не получали медикаментозные препараты. Предварительно они были отнесены к трем физиологическим группам – щенки, взрослые здоровые и взрослые с расстройством стула. Рацион животных

включал отечественные промышленные полнорационные корма «Дилли» для взрослых собак и щенков «Говяжий гуляш с овсянкой», «Рагу из курицы с рисом» (ЗАО «Алейскзернопродукт» им. С.Н. Старовойтова, Алейск, Россия) – 5 раз в неделю. Теплая пища в виде зерновых каш с мясными субпродуктами готовилась 2 раза в неделю. Мясная продукция поступала в основном в вареном виде, раз в неделю давали лакомство – кости с остатками мяса. Описание исследованных животных приведено в таблице 1. Отбор материала проводили в индивидуальные стерильные пробирки объемом 2 мл, содержащие 300 мкл буфера для выделения ДНК, pH 8.0 (50 мМ Трис-HCl, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl).

Таблица 1 – Описание исследуемой группы собак

№	Порода	Пол	Возраст	Фекалии
D1	б/п	Сука	10 лет	Норма
D2	б/п	Кобель	7 месяцев	Норма
D3	б/п	Сука	3 месяца	Норма
D4	б/п	Сука	6 месяцев	Норма
D5	б/п	Кобель	15 лет	Норма
D6	б/п	Кобель	5 лет	Норма
D7	метис	Кобель	3 года	Норма
D8	б/п	Сука	3 года	Норма
D9	б/п	Сука	7 лет	Норма
D10	б/п	Кобель	6 лет	Жидкий стул
D11	б/п	Кобель	5 лет	Жидкий стул
D12	б/п	Сука	2 года	Жидкий стул

Биоматериал из кишечника массой 250 мкг суспендировали в буфере и добавляли раствор лизоцима до 1% концентрации фермента. Для лизиса полисахаридной оболочки бактерий, пробирки инкубировали 30-60 минут при температуре 37°C, после чего добавляли протеиназу К (рабочая концентрация 20 мкг/мл) и 10 % раствор додецил сульфата натрия до 1% концентрации с последующим выдерживанием при температуре 55°C в течении полутора часов. После проведения ферментативного лизиса биоматериала, проводили удаление клеточного содержимого фенолом и хлороформом, очищенную водную фракцию подвергали осаждению

3М ацетатом натрия в объемном соотношении 1:10 в 70% этаноле. Смесь выдерживали в холодильнике в течение 12 часов при -4°C, после чего промывали осадок холодным 80% спиртом, высушивали и использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Для метагеномного анализа фрагмента гена 16S рРНК использовали праймеры, комплементарные следующим позициям ДНК: 343F (CTCCTACGGRRSGCAG) и 806RB (GGACTACNVGGGTWTCTAAT). Секвенирование выполняли в компании Geneoffice (Санкт-Петербург) с помощью MiSeq (Illumina, USA). Оценку качества библиотек ампликонов проводили с по-

мощью программы FastQC v. 0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>, дата последнего доступа: 8 января 2024 г.), адаптеры и праймеры удалены с помощью программы cutadapt v1.14. Метагеномные данные обработаны с использованием пакета DADA2 для языка программирования R с параметрами: maxN (максимальное количество допустимых неопределенных оснований) = 0, maxEE (максимальное количество ожидаемых ошибок прочтения в последовательности) = с (2,4), включая выравнивание, фильтрацию химер и коротких последовательностей и кластеризацию точных вариантов последовательностей (ASV – Amplicon Sequencing Variant) [16]. Фрагменты гена 16S рПНК выровнены и таксономически отнесены с использованием базы данных SILVA v.138.1 с доверительным порогом 80% [17] и кластеризованы в операционные таксономические операционные единицы ОТЕ на расстоянии 0,03 с помощью mothur v.1.45.0 [18]. Для уточнения вида микроорганизма осуществляли дополнительный поиск данных с помощью BLAST-анализа на осно-

ве базы RefSeq nr (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Данные депонированы в базу данных GenBank, номер PRJNA1087158.

Показатели альфа - разнообразия рассчитаны с использованием средств языка программирования R v.4.1.2 и пакета “vegan”. Для дальнейшего статистического анализа полученные библиотеки были нормализованы путём случайной фиксированной выборки по наименьшему образцу (8201 последовательность в образце).

Различия в процентном содержании ОТЕ у групп собак, объединённых по признаку стула и возраста, оценивали непараметрическим критерием Манна-Уитни (парный тест, $P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Всего получено 147150 последовательностей фрагмента гена 16S рПНК из 12 образцов содержимого кишечника собак. На каждый образец приходилось от 8201 до 18734 последовательностей. Индексы разнообразия бактерий из кишечника собак показали неоднородные данные (Рисунок 1).

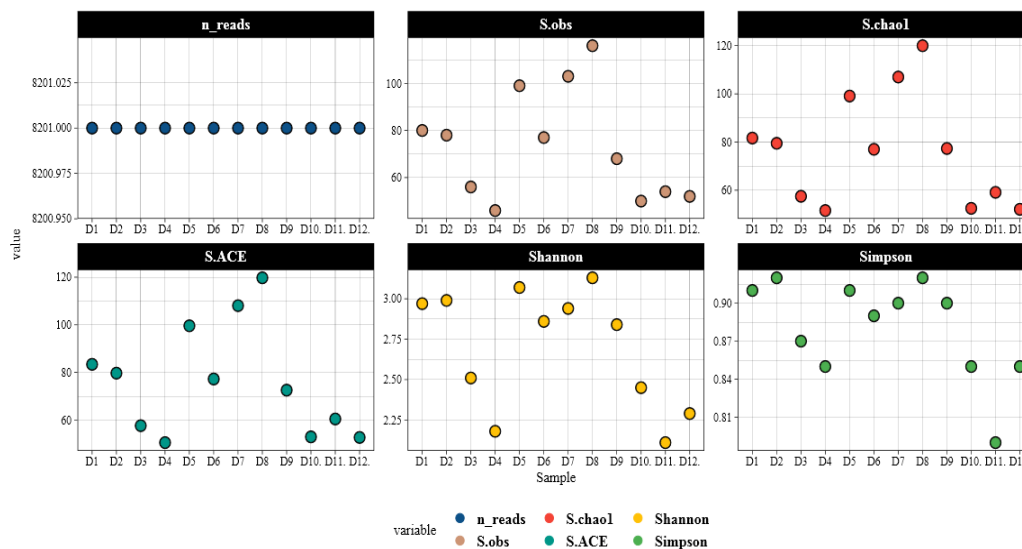


Рисунок 1 – Анализ разнообразия микробиома, выполненный на основе нормализованных данных. D10, D11, D12 – помечены как животные с расстройством стула, D3, D4 – щенки 3, 4 месяцев.

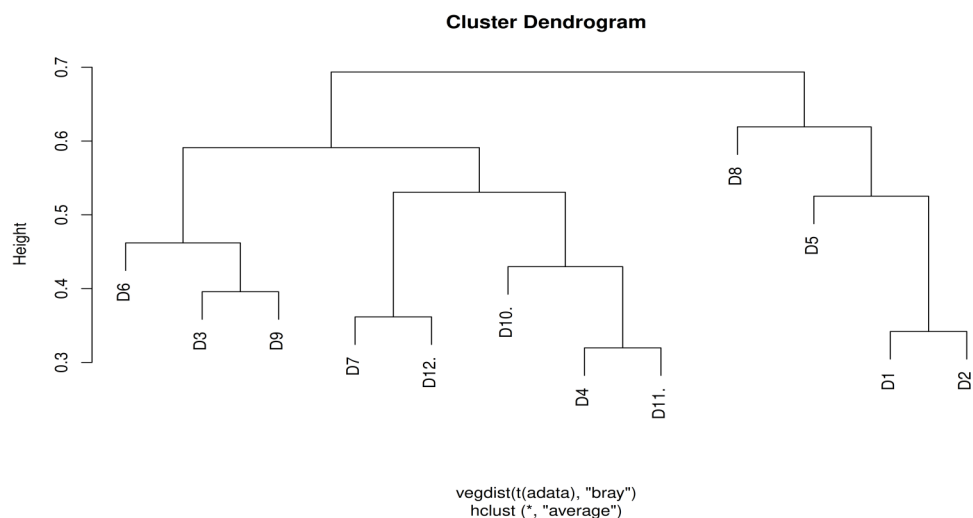


Рисунок 2 – Дендрограмма сообществ кишечника собак, построенная методом иерархической кластеризации UPGMA. D10, D11, D12 – животные с расстройством стула.

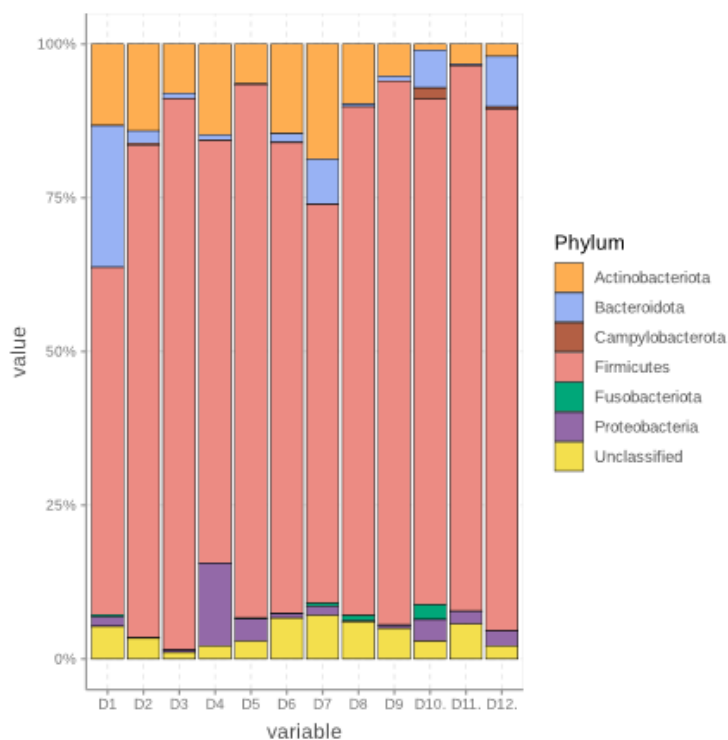


Рисунок 3 – Состав микробиоты кишечника собак на уровне филумов. Точками помечены животные с расстройством стула. D10, D11, D12 – животные с расстройством стула.

После нормализации коэффициенты разнообразия отличались даже внутри физиологических групп. Индексы выявили сообщества бактерий с низким видовым богатством – это щенки D3, D4, и животные с расстройством стула D10, D11, D12. Наибольшим видовым богатством характеризовались микробиомы животных D5, D7, D8, средним – D1, D2. Согласно индексам Шеннона и Симпсона, устойчивыми и разнообразными сообществами бактерий являлись микробиомы животных D1, D2, D5, D6, D7, D8, D9 (особи старше 7 месяцев с нормальным стулом), в них различные группы бактерий представлены достаточно равномерно.

Кластеризация наших данных методом UPMGA показала, что микробный состав сообществ кишечника собак не зависит от качества стула, пола, возраста (Рисунок 2).

В кишечном микробиоме собак доминировали бактерии филума Firmicutes (около 80%), в общей сложности представленные 274 ОТЕ. Далее следовали Actinobacteriota – 42 ОТЕ, Bacteroidota – 21 ОТЕ, Proteobacteria – 15 ОТЕ (Рисунок 3).

Маркерной филлой для хищников является Fusobacteriota. В нашем исследовании бактерии филы Fusobacteriota отсутствовали у щенков (особи D2, D3, D4) и у некоторых собак с жидким стулом (D9 и D11). Известно, что доля Fusobacteriota снижается при диетах со значительным количеством пищевых волокон [6]. Также представленность их невысока при кормлении сухими кормами независимо от сбалансированности и дороговизны корма. Однако при включении сырого мяса в рацион собак и волков, Fusobacteriota составляют очень заметную долю в микробиоме [19]. Несмотря на то, что Fusobacteriota могут обитать в растительных волокнах (свекла), эта группа положительно коррелирует с питанием сырыми мясopодуктами, исчезая при кормлении термически обработанными продуктами [11]. В отличие от людей, для которых *Fusobacterium spp.* является неблагоприятным

микроорганизмом, ассоциированным с колоректальным раком, заболеваниями десен [20], для собак эти группы не коррелируют с заболеваниями [9].

Филум Firmicutes представлен семействами Lactobacillaceae, Veillonellaceae, Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae и Lachnospiraceae. Среди филума доминировали представители семейства *Lactobacillaceae*. Наиболее представленные рода *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Ligalactobacillus*, *Weissella* и *Streptococcus* известны своим пробиотическим потенциалом (Рисунок 4). Отдельное внимание мы уделили доминированию в микробиоме ОТЕ *Streptococcus*. При уточнении их видовой принадлежности в базе данных через RefSeq, оказалось, что они принадлежат непатогенным видам *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*, которые относятся к молочнокислым бактериям.

Семейство клостридий *Veillonellaceae*, а именно *Megasphaera* и *Megamonas*, как резидентная микрофлора кишечника, продуцирует важные для пищеварения короткоцепочечные жирные кислоты. Другими семействами этого класса являлись свободноживущие клостридии семейств *Clostridiaceae* (*Clostridium*), *Peptostreptococcaceae* (*Peptoclostridium*, *Romboutsia*, *Terrisporobacter*) и *Lachnospiraceae* (*Blautia*). Основной их функцией является продукция важных для кишечника органических кислот – ацетата, бутирата, лактата, пирувата. *Blautia* – анаэробы с пробиотическими характеристиками, широко встречающиеся в фекалиях и кишечнике млекопитающих [21]. Семейство *Erysipelotrichaceae* представлено доминирующими родами *Turicibacter*, *Allobaculum*, *Holdemanella*, *Dubosiella*, *Faecalibaculum*, *Catenibacterium* и *Erysipelatoclostridium*, важными для метаболизма и гомеостаза кишечника хозяина. Так, например, штаммы бактерии *Turicibacter* способны к разным типам трансформации желчных кислот, влияя на обмен холестерина [22].

Actinobacteriota принадлежали двум классам и семействам *Eggerthellaceae*, *Atopobiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Dermabacteraceae*, *Coriobacteriaceae*, *Intrasporan-*

giaceae, Micrococcaceae. Представители доминирующего семейства Bifidobacteriaceae представлены родом Bifidobacterium, а Coriobacteriaceae – типичными обитателями кишечника, родами Collinella, Muricaecibacterium и Slackia.

Протеобактерии составляли 2,7% от общего количества выявленных ОТЕ. У исследуемых животных обнаружены представители порядка Enterobacterales (Escherichia-Shigella), их присутствие в основном коррелировало с диареей и щенячим возрастом. Классические обитатели кишечника - Parasutterella, Sutterella (Burkholderiales) и другие бактерии встречались спорадически. По данным наших исследований выявлено, что бактерии видов Sutterella чаще встречались в микробиоме собак от 2 лет и более, Parasutterella - у щенят до года.

Представленность Bacteroides в кишечнике собак иркутского приюта была невысока, нами отмечены представители семейств Prevotellaceae, Sphingobacteriaceae, Bacteroidaceae, Muribaculaceae, Weeksellaceae, Tannerellaceae и нового семейства Bacteroidales unclassified, по молекулярно-биологическим данным характерного также для кишечника человека.

Бактерии филы Campylobacterota при-

существовали только у щенков и у двух собак с расстройством кишечника (Campylobacter upsaliensis). Предположительно, расстройство пищеварения двух взрослых животных связано с нарушениями иммунной системы и оппортунистической инфекцией – кампилобактериозом. В кишечниках щенков найдено небольшое количество последовательностей бактерий Helicobacter canicola, которые являются «энтерогепатическими», то есть участвующими в циркуляции желчных кислот.

Использование статистических методов подтвердило значимое изменение микрофлоры кишечника при диарее. Микробиом животных с признаками диареи содержал меньшую долю представителей родов Faecalibacterium и Blautia, а также бактерий Peptacetobacter hiranonis (Таблица 2). Интерпретацию результата индекса дисбиоза следует проводить наряду с уровнями отдельных бактериальных таксонов, особенно C. hiranonis (=Peptacetobacter hiranonis), поскольку снижение последнего является основным фактором, способствующим аномальному микробиому [12].

Широко распространенная в микро-

Таблица 2 – Различия в представленности бактерий микробиома в группах животных с признаками нормального пищеварения и его отклонениями. Анализ выполнен с помощью парного теста Манна-Уитни, $p \leq 0,05$

ОТЕ	Царство;Филум;Класс;Порядок;Род; вид	Норма (n=6), %	Диарея (n=3), %
002	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus; <i>Lactobacillus johnsonii</i>	5,0	22,0
008*	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Lachnospirales; Lachnospiraceae; Blautia; <i>Blautia luti</i>	7	0,1
015*	Bacteria; Bacillota; Clostridia; Eubacteriales; Peptostreptococcaceae; Peptacetobacter; <i>Peptacetobacter hiranonis</i>	1	0,2
054*	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Oscillospirales; Ruminococcaceae; Faecalibacterium; <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,18	0,0
024	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae; Holdemanella; <i>Holdemanella hominis</i>	0,3	0,0
047	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Lachnospirales; Lachnospiraceae; Unclassified	0,2	0,0

*используются для определения дисбиоза кишечника



Рисунок 4 – Состав микробиоты кишечника собак на уровне родов и семейств. Звездочками помечены особи с расстройством стула.

биома кишечника исследуемых собак бактерия *Lactobacillus johnsonii* значительно больше выявлялась у собак с признаками диареи. По-видимому, этот вид самый устойчив к расстройству кишечника, он компенсирует или возникает как ответ на нарушения при дисбиозе. Большое количество исследований показыва-

ет, что *L. johnsonii* проявляет следующие полезные способности: противовоспалительные, иммуномодулирующие, баланс кишечной микрофлоры и защита кишечного барьера [23].

Обобщая данные, следует отметить, что в нашем исследовании выявлено значительное количество молочнокислых

бактерий в кишечнике собак, по сравнению с литературными данными [1, 2]. Мы предполагаем, что состав корма Дилли способствует стимуляции роста этой группы бактерий. Известно, что пребиотиком для молочнокислых бактерий является клетчатка, которая присутствует в рационе собак приюта в достаточном количестве. Здесь мы в очередной раз видим подтверждение правил Бейеринка, касающихся экологии микроорганизмов: «Все повсюду, но среда определяет». Исходя из доминирования *Lactobacillales*, возникает и уменьшение характерной, маркерной для кишечника хищников *Fusobacteriota*. Ранее показано, что добавление кефира в рацион собак значительно редуцировало присутствие *Fusobacteriota* в микробиоме кишечника [24]. Отечественные исследования подтвердили этот факт, и численность фузобактерий уменьшилась в результате добавления в рацион соответствующей биодобавки, вероятно, содержащей молочнокислые бактерии [15].

Наши результаты, как и анализ литературы, показывают, что состав и функции бактерий кишечной микробиоты исследованных собак может очень варьировать в зависимости от состава корма. Повидимому, кишечная микрофлора этой группы млекопитающих очень пластична и к определению дисбиоза у собак надо подходить очень аккуратно. В нашем исследовании, дисбиоз отличалось более низкими индексами видового разнообразия. Преобладание сложноуглеводной диеты сопровождалось доминированием бактерий семейства *Lactobacillaceae* в микробиоме всех особей и нетипично малой представленностью *Fusobacteriaceae*. Таксономическое разнообразие микробиома щенков и собак с диареей было несколько ниже здоровых взрослых животных. Бактерии родов *Blautia*, *Faecalibacterium* и вида *Peptacetobacter hiranonis* у собак с диареей были менее представлены, что согласуется с общепринятым представлением о дисбиозе кишечной микробиоты собак.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Изучение состава кишечника животных в зависимости от физиологических особенностей и питания всегда интересно для клинической практики. Бактерии осуществляют ферментативные процессы, ведущие к производству ценных питательных или сигнальных молекул. Понимая, что текущая политическая ситуация не позволяет отечественной ветеринарии использовать секвенирование нового поколения для животных в должном объеме, мы предлагаем использовать наши данные для последующей разработки и внедрения методик количественной полимеразной цепной реакции на отдельные группы микроорганизмов.

BIOLOGICAL MOLECULAR CHARACTERISTICS OF INTESTINAL MICROBIOTICINOSIS OF DOGS ON A MIXED DIET

Loginov S.N.^{*1} – postgraduate student, Department of Special Veterinary Disciplines (ORCID: 0000-0002-4220-1009); **Batomunkuev A.S.**¹ – D.Sc. (Veterinary Science), Assoc. Prof., Assoc. Prof., Department of Special Veterinary Disciplines (ORCID: 0000-0002-2263-6355); **Sukhinin A.A.**² – D.Sc. (Biol. Science), Prof., Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology (ORCID: 0000-0002-1245-3440); **Krasnopeev A.Yu.**³ – research associate (ORCID: 0000-0002-3368-4678); **Gorshkova A.S.**³ – Ph.D. (Biol. Science), research associate. (ORCID: 0000-0003-2408-0837); **Belykh O.I.**³ – Ph.D. in Biology, Assoc. Prof., Leading Researcher (ORCID: 0000-0002-1188-7351); **Lipko I.A.**³ – Ph.D. in Biology, Researcher (ORCID: 0000-0002-6214-2974); **Potapov S.A.**³ – Researcher (ORCID: 0000-0003-1391-6731); **Tikhonova I.V.**³ – Ph.D. in Biology, Senior Researcher (ORCID: 0000-0002-4323-6799).

¹Irkutsk State Agrarian University named after A.A. Yezhevsky;

²St. Petersburg State University of Veterinary Medicine.

³Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

*sergyn21@yandex.ru

ABSTRACT

Metabarcoding research of the domestic animal intestines is relevant for veterinary medicine. The effect of feeding and food additives on its gut microbiome is of both applied and fundamental significance and demonstrates the stimulation of the various groups of bacteria development. The objective of our work is to study the effect of the domestic complete pet feed Dilly on the microbial community of the dogs' intestines in breeding kennel of Irkutsk. The microbiome composition was determined in 12 animals of different ages having used Illumina MiSeq amplicon sequencing of the V3-V4 region of 16S rRNA. Rates diversity had been adapted to evaluate the affluence and prominence of Bacterial operational and taxonomic units and nonparametric Mann-Whitney criteria (correlative test, $p \leq 0,05$) used to evaluate the certainty value of the difference of operational and taxonomic unit percentage in different physiological groups. All in all, 147150 the 16S rRNA gene fragment sequences were obtained. The dominant bacteria turned out to be the phyla Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota, and Proteobacteria. The animals that had been under research had almost no Fusobacteriota bacteria - markers of a diet with a predominance of raw meat (predation). The Firmicutes phylum included bacteria from five families. The most numerous families among the Firmicutes were the Lactobacillaceae bacteria. Representatives of seven families were observed among Actinobacteriota bacteria, of which Bifidobacteriaceae predominated. Proteobacteria of the Enterobacterales order and Burkholderiales made up a small proportion of the entire community and depended on the animal age. The research result could be used in perspective to enlarge knowledge about the digestive process in an omnivorous animal of the wolf pack. These animals have a more or less flexible microbiome, which has several variants of normal composition. There predominated lactic acid bacteria in the microbial communities of the dogs' intestines, which consumed feed that contained

coarse dietary fibers. In its turn, lactic acid bacteria reduced the number of Fusobacteriota.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pereira A.M. et al. Dogs' microbiome from tip to toe / A.M. Pereira, A. Clemente // Top Companion Anim Med. 2021. 45. P. 100584.
2. Garrigues Q. et al. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors / Q. Garrigues, E. Apper, S. Chastant, H. Mila // Front. Vet. Sci. 2020. 9. P. 964649. doi: 10.3389/fvets.2022.964649
3. Benno Y. et al. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs / Y. Benno, H. Nakao, K. Uchida, T. Mitsuoka // J Vet Med Sci. 1992. 54(4). P. 703. doi: 10.1292/jvms.54.703.
4. Сухинин А.А. Генетическое разнообразие бактерий кишечника крупного рогатого скота, выявленное с помощью высокопроизводительного секвенирования / А.А. Сухинин, А.Ю. Краснопеев, А.С. Горшкова [и др.] // Международный вестник ветеринарии. 2022. № 3. С. 27-36. DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.3.27.
5. Suchodolski J. et al. Analysis of bacterial diversity in the canine duo-denum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis / J. Suchodolski, J. Camacho, J.M. Steiner // FEMS Microbiol Ecol. 2008. 66. P. 567. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x.
6. Middelbos I.S. et al. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing / I.S. Middelbos, B.M. Vester Boller, A. Qu, B.A. White, K.S. Swanson, G.C. Jr Fahey // PLoS ONE. 2010. 5(3). P. 9768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
7. Lin Ch.-Y. et al. Longitudinal fecal microbiome and metabolite data demonstrate rapid shifts and subsequent stabilization after an abrupt dietary change in healthy adult dogs / Ch.-Y. Lin, J. Aashish, P. Oba // J. Animal Microbiome. 2020. 46(4) DOI: 10.1186/s42523-022-00194-9

8. Suchodolski J. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 2022. 50. P. 6. <https://doi.org/10.1111/vcp.13031>
9. Vazquez-Baeza E.R. et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks / E.R. Vazquez-Baeza, J.S. Hyde, Knight R. Suchodolski // *Nat Microbiol*. 2016. 1. P. 16177
10. Pilla R. et al. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease / R. Pilla, J.S. Suchodolski // *Front. Vet. Sci*. 2020. 6. P. 498.
11. Pilla R. et al. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet / R. Pilla, J.S. Suchodolski // *Veter Clin. N. Am. Small Anim. Pract*. 2021. 51. P. 605.
12. Alshawaqfeh M.K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy / M.K. Alshawaqfeh, B. Wajid, Y. Minamoto // *FEMS Microbiol Ecol*. 2017. 93 (11).
13. Крылова И.О. и др. Индикаторные микроорганизмы-контаминанты кишечного микробиома щенков бельгийской овчарки (ма-линуа) / И.О. Крылова, Ю.Р. Садыкова // *Вестник Пермского университета. Сер. Биология*. 2020. Вып. 4. С. 303-311. DOI: 10.17072/1994-9952-2020-4-303-311.
14. Крылова И.О. и др. Оценка состояния кишечного микробиома служебных собак по индексу колонизационной резистентности / И.О. Крылова, Ю.Р. Садыкова // *Проблемы медицинской микологии*. 2021. Т.23 (2). С. 97.
15. Дуняшев Т.П. и др. Влияние пробиотика профорт® на микробиом кишечника собак / Т.П. Дуняшев, Т.Н. Ромадина, Д.Г. Тюрина, Л.А. Ильина, Ю.Е. Кузнецов // *Ветеринария*. 2022. №7. С. 51-54.
16. Callahan B. et al. High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. Callahan, P. McMurdie, M. Rosen, A.W. Han, A.J.A. Johnson, S.P. Holmes // *Nat. Methods* 2016. 13. P. 581.
17. Quast C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools / C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glöckner // *Nucleic Acids Res*. 2013. 41. P. 590.
18. Schloss, P.D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson // *Appl. Environ. Microbiol*. 2009. 75. P. 7537.
19. Lyu T. et al. Changes in feeding habits promoted the differentiation of the composition and function of gut microbiotas between domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and gray wolves (*Canis lupus*) / T. Lyu, G. Liu, H. Zhang, L. Wang, S. Zhou, H. Dou // *AMB Exp*. 2018. 8. P. 123. doi: 10.1186/s13568-018-0652-x.
20. Amitay E.L. et al. *Fusobacterium* and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study / E.L. Amitay, S. Werner, M. Vital // *Carcinogenesis*. 2017. 38(8). P. 781.
21. Liu X. et al. *Blautia* – a new functional genus with potential probiotic properties? / X. Liu, B. Mao, J. Gu, J. Wu, S. Cui, G. Wang, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen // *Gut Microbes*. 2021. 13. P. 1. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796
22. Lynch J.B. et al. Gut microbiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids / J.B. Lynch, E.L. Gonzalez, K. Choy // *Nat Commun*. 2023. 14. P. 3669 <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39403-7>
23. Zhang Z. et al. The effects of *Lactobacillus johnsonii* on diseases and its potential applications / Z. Zhang, L. Zhao, J. Wu, Y. Pan, G. Zhao, Z. Li, L. Zhang // *Microorganisms*. 2023. 11. P.2580. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102580>
24. Kim D.-H. et al. Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product / D.-H. Kim, D. Jeong, I.-B. Kang, H.-W. Lim, Y. Cho, K.-H. Seo // *Journal of Dairy Science*. 2019. V. 102 (5). P. 3903.

REFERENCES

1. Pereira A.M. et al. Dogs' microbiome from tip to toe / A.M. Pereira, A. Clemente // *Top Companion Anim Med.* 2021. 45. P. 100584.
2. Garrigues Q. et al. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors / Q. Garrigues, E. Apper, S. Chastant, H. Mila // *Front. Vet. Sci.* 2020. 9. P. 964649. doi: 10.3389/fvets.2022.964649
3. Benno Y. et al. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs / Y. Benno, H. Nakao, K. Uchida, T. Mitsuoka // *J Vet Med Sci.* 1992. 54(4). P. 703. doi: 10.1292/jvms.54.703.
4. Sukhinin A.A. Geneticheskoe raznoobrazie bakterij kishechnika krupnogo rogatogo skota, vy'yavlennoe s pomoshh'yu vy'sokoproizvoditel'nogo sekvenirovaniya [Genetic diversity of cattle intestinal bacteria revealed using high-throughput sequencing] / A.A. Sukhinin, A.Yu. Krasnopeev, A.S. Gorshkova [et al.] // *International Bulletin of Veterinarian Medicine.* 2022. No. 3. P. 27-36. DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.3.27.
5. Suchodolski J. et al. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis / J. Suchodolski, J. Camacho, J.M. Steiner // *FEMS Microbiol Ecol.* 2008. 66. P. 567. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x.
6. Middelbos I.S. et al. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing / I.S. Middelbos, B.M. Vester Boller, A. Qu, B.A. White, K.S. Swanson, G.C. Jr Fahey // *PLoS ONE.* 2010. 5(3). P. 9768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009768>
7. Lin Ch.-Y. et al. Longitudinal fecal microbiome and metabolite data demonstrate rapid shifts and subsequent stabilization after an abrupt dietary change in healthy adult dogs / Ch.-Y. Lin, J. Aashish, P. Oba // *J. Animal Microbiome.* 2020. 46(4) DOI: 10.1186/s42523-022-00194-9
8. Suchodolski J. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 2022. 50. P. 6. <https://doi.org/10.1111/vcp.13031>
9. Vazquez-Baeza E.R. et al. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks / E.R. Vazquez-Baeza, J.S Hyde, Knight R. Suchodolski // *Nat Microbiol.* 2016. 1. P. 16177
10. Pilla R. et al. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease / R. Pilla, J.S. Suchodolski // *Front. Vet. Sci.* 2020. 6. P. 498.
11. Pilla R. et al. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet / R. Pilla, J.S. Suchodolski // *Veter Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 2021. 51. P. 605.
12. Alshawaqfeh M.K. et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy / M.K. Alshawaqfeh, B. Wajid, Y. Minamoto // *FEMS Microbiol Ecol.* 2017. 93 (11).
13. Krylova I.O. et al. Indikatornye mikroorganizmy-kontaminanty kishechnogo mikrobioma shhenkov bel'gijskoj ovcharki (malinua) [Indicator microorganisms-contaminants of the intestinal microbiome of Belgian Sheepherd (Malinois) puppies] / I.O. Krylova, Yu.R. Sadykova // *Bulletin of Perm University. Series: Biology.* 2020. Issue. 4. P. 303-311. DOI: 10.17072/1994-9952-2020-4-303-311.
14. Krylova I.O. et al. Ocenka sostoyaniya kishechnogo mikrobioma sluzhebnykh sobak po indeksu kolonizatsionnoy rezistentnosti [Assessment of the state of the intestinal microbiome of service dogs using the colonization resistance index] / I.O. Krylova, Yu.R. Sadykova // *Problems of Medical Mycology.* 2021. Vol. 23 (2). P. 97.
15. Dunyashev T.P. et al. Vliyanie probiotika profort® na mikrobiom kishechnika sobak [The effect of the probiotic Profort® on the intestinal microbiome of dogs] / T.P. Dunyashev, T.N. Romadina, D.G. Tyurina, L.A. Ilyina, Yu.E. Kuznetsov // *Veterinary Science.* 2022. No. 7. P. 51-54.
16. Callahan B. et al. High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. Callahan, P. McMurdie, M. Rosen, A.W.

- Han, A.J.A. John-son, S.P. Holmes // Nat. Methods 2016. 13. P. 581.
17. Quast C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools / C. Quast, E. Pruesse, P. Yil-maz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glöckner // Nucleic Acids Res. 2013. 41. P. 590.
18. Schloss, P.D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson // Appl. Environ. Microbiol. 2009. 75. P. 7537.
19. Lyu T. et al. Changes in feeding habits promoted the differentiation of the composition and function of gut microbiotas between domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and gray wolves (*Canis lupus*) / T. Lyu, G. Liu, H. Zhang, L. Wang, S. Zhou, H. Dou // AMB Exp. 2018. 8. P. 123. doi: 10.1186/s13568-018-0652-x.
20. Amitay E.L. et al. *Fusobacterium* and colorectal cancer: causal factor or passenger? Results from a large colorectal cancer screening study / E.L. Amitay, S. Werner, M. Vital // Carcinogenesis. 2017. 38(8). P. 781.
21. Liu X. et al. *Blautia* – a new functional genus with potential probiotic properties? / X. Liu, B. Mao, J. Gu, J. Wu, S. Cui, G. Wang, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen // Gut Microbes. 2021. 13. P. 1. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796
22. Lynch J.B. et al. Gut microbiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids / J.B. Lynch, E.L. Gonzalez, K. Choy // Nat Commun. 2023. 14. P. 3669 <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39403-7>
23. Zhang Z. et al. The effects of *Lactobacillus johnsonii* on diseases and its potential applications / Z. Zhang, L. Zhao, J. Wu, Y. Pan, G. Zhao, Z. Li, L. Zhang // Microorganisms. 2023. 11. P. 2580. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102580>
24. Kim D.-H. et al. Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product / D.-H. Kim, D. Jeong, I.-B. Kang, H.-W. Lim, Y. Cho, K.-H. Seo // Journal of Dairy Science. 2019. V. 102 (5). P. 3903.