

УДК 579.852.13:616.33-008.8:636.2

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.205

РАЗНООБРАЗИЕ ФОРМ КЛОСТРИДИЙ В РУБЦОВОМ СОДЕРЖИМОМ ДОЙНЫХ КОРОВ И КОРОВ НА ОТКОРМЕ

Моисеева К.А.¹ – асп. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Тарлавин Н.В.¹ – асс. каф. эпизоотологии им. В.П. Урбана, Веретенников В.В.¹ – асс. кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, Сухинин А.А.¹ – д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Йылдырым Е.А.² – д.б.н., биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории, Попова М.Р.³ – лаб. отд. молекулярной диагностики, Баимова Р.Р.⁴ – лаб. исследователь лаборатории зооантропонозных инфекций
ФГБОУ ВО СПбГУВМ, 2- ООО Биотроф, 3- ООО Эксплана, 4- ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Ключевые слова: NGS-секвенирование, рубец, лактирующие коровы, коровы на откорме, микробиом жвачных. **Keywords:** NGS sequencing, rumen, lactating cows, fattening cows, ruminant microbiome.

РЕФЕРАТ

Статья посвящена изучению бактериального состава микробиома рубца коров с целью дифференциации бактерий вида *Clostridium* в содержимом рубца, в зависимости от продуктивности и типа кормления. Тема исследования является актуальной, так как микробиом рубца коров напрямую влияет на физиологические показатели как коров дойного стада, так и коров на откорме. Некоторые энтеротоксинпродуцирующие грамположительные облигатно анаэробные бактерии класса *Clostridia* нередко являются причиной развития гистотоксических инфекций. Однако необходимо понимать, что большинство клостридий вовсе не являются возбудителями инфекционных болезней, а участвуют в обменных процессах, протекающих в рубце, способствуя поддержанию жизнедеятельности и способствуя увеличению сельскохозяйственной продукции.

Большой диагностической ценностью обладает метод NGS-секвенирования, используемый в исследовании микробиома рубца двух групп коров – коров на откорме и коров дойного стада. Результаты исследования сведены в Таблицу 1. Таксономическую принадлежность микроорганизмов до рода определяли в программе RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>). При исследовании образцов, полученных от коров на откорме, наиболее часто встречался представитель семейства *Ruminococcaceae*, бактерия *Clostridium viride*, содержание которой достигало 2,6% от всех микроорганизмов, обнаруженных в содержимом рубца коров. Данная бактерия имеет в качестве продуктов ферментации (в зависимости от субстрата роста) аммиак, ацетат, пропионат, бутират и валерат, что имеет большое значение для физиологических показателей крупного рогатого скота, поскольку влияет на рост и развитие ворсинок рубца. В образцах, полученных от дойных коров, количество данных бактерий достигало 2,1% от всех обнаруженных микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение функций желудочно-кишечного тракта и нервной системы крупного рогатого скота чаще происходит с изменением структуры, химического и микробиологического составляющих питания. По статистике, основной причиной болезней молодняка крупного рогатого скота, являются болезни

желудочно-кишечного тракта (до 100 %), на втором – поражения респираторного тракта (до 62,4 %), на третьем – полиартриты (до 49,1 %) [1]. Основным этиологическим фактором различных болезней коров дойного стада являются вирусные и бактериальные инфекции, а также их ассоциации. Нередко возбудителем подобных болезней являются облада-

Таблица 1

Содержание форм клостридий в рубцовом содержимом дойных коров и коров на откорме, %.

Семейство	Род	Вид	Коровы на откорме, образец №1	Коровы на откорме, образец №2	Коровы на откорме, образец №3	Дойные коровы, образец №1	Дойные коровы, образец №2	Дойные коровы, образец №3
<i>Clostridiaceae 1</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium vincentii</i>	0,19	0,13	0,07	0,09	0,11	0,03
<i>Clostridiales Incertae Sedis XI</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium purinolyticum</i>	0,03	0,03	0,01	0,20	0,11	0,08
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium aminophilum</i>	0,19	0,15	0,58	0,03	0,03	0,03
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium bolteae</i>	0,01	0,01	0,00	0,05	0,25	0,06
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium lactatifermentans</i>	0,02	0,04	0,04	0,02	0,15	0,09
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium lactatifermentans</i>	0,01	0,01	0,04	0,06	0,17	0,04
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium colinum</i>	0,07	0,01	0,18	0,01	0,02	0,01
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium viride</i>	2,60	1,52	2,24	0,19	0,28	2,10
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium leptum</i>	0,00	0,03	0,00	0,12	0,17	0,06
Прочие клостридии			0,10	0,34	0,08	0,15	0,38	0,19

ющие энтеротоксинпродуцирующими свойствами грамположительные облигатно анаэробные бактерии класса Clostridia. Данные бактерии входят в число наиболее распространенных и актуальных патогенов человека, птиц и скота, являясь причиной развития гистотоксических инфекций.

Целью исследований являлось изучение видового разнообразия клостридий у групп коров на откорме и коров дойного стада.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе микробиологической лаборатории ООО «Биотроф». Материал исследования – содержимое рубца коров 2 групп. В первую группу вошли коровы дойного стада, во вторую – коровы на откорме. Отбор проб рубцового содержимого (10-50 г) от коров каждой группы проводили, соблюдая условия асептики,

вручную с использованием стерильного зонда в соответствии с общепринятыми методиками.

Тотальную ДНК из исследуемых образцов выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно прилагаемой инструкции. Анализ основан на селективном детергентно-опосредованном осаждении ДНК из субстрата с применением растворов для лизиса клеточных стенок, осаждения ДНК, раствора 1,2 М хлорида натрия, хлороформа. Амплификацию для последующего NGS-секвенирования проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью зубактериальных праймеров (IDT) 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК. Режим амплификации. Использовали следующий режим амплификации: 3 мин при 95 °C (1 цикл); 30 с при 95 °C, 30 с при 55 °C, 30 с при 72 °C (25 циклов); 5 мин при 72 °C (1 цикл).

Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2х300 п.н. Химерные последовательности исключали из анализа с помощью программы USEARCH 7.0 (<http://drive5.com/usearch/>). Обработка полученных ридов с помощью биоинформатической платформы CLC Bio GW 7.0 («Qiagen», Нидерланды) включала в себя перекрытие, фильтрацию по качеству (QV > 15), триммирование праймеров. Таксономическую принадлежность микроорганизмов до рода определяли в программе RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Погрешность прибора MiSeq, на котором проводили NGS-секвенирование составляла 5%.

По итогам проведенных исследований получены следующие результаты.

В рубцовом содержимом отсутствовали патогенные клостридии, такие как *Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium histolyticum* и прочие.

При исследовании образцов, полученных от коров на откорме, наиболее часто встречался представитель семейства Ruminococcaceae, бактерия *Clostridium viride*, содержание кото-

рой достигало 2,6% от всех микроорганизмов, обнаруженных в содержимом рубца коров. Данная бактерия, ранее носившая название *Clostridium aminovalericum*, имеет в качестве продуктов ферментации (в зависимости от субстрата роста) аммиак, ацетат, пропионат, бутират и валерат. В рубце коров соединения ацетата и бутирата имеют большое значение для физиологических показателей, поскольку влияют на рост и развитие ворсинок рубца, при использовании данных коров с целями откорма.

В образцах, полученных от дойных коров, количество данных бактерий также было велико (достигало 2,1% от всех обнаруженных микроорганизмов). Согласно исследованиям, проведенным Buckel и Janssen [2], данные формы клостридий также повышают продуцирование коровами молочного жира.

Необходимо отметить явное различие между двумя исследованными группами в содержании такого представителя семейства Lachnospiraceae, как *Clostridium aminophilum*. В среднем, количество данных бактерий у коров на откорме составляло 0,3% от всех обнаруженных в рубце микроорганизмов, что в 10 раз превосходило среднее содержание данных клостридий в рубце дойных коров (0,3%). По исследованиям, проведенным Paster и Russell [3], данные микроорганизмы определяются как рубцовые микробы, роль которых складывается из продуцирования аммиака, за счет поступающих в рубец аминокислот.

Среди образцов рубцового содержимого коров дойного стада, напротив, явно выделялось присутствие представителя семейства Clostridiales Incertae Sedis XI, микроорганизма *Clostridium purinilyticum*. В среднем, содержание данного микроорганизма в образцах от коров дойного стада составляло 0,13% от всех обнаруженных микроорганизмов, что в среднем превышало содержание данного микроорганизма в рубце коров на откорме до 10 раз. Роль данных микроорганизмов, согласно исследованиям Durte и Andersch [4], заключается также в ферментировании аминокислот. При использовании аденина в качестве пуринового субстрата роста, данная клостридия в процессе ферментации производит ацетат, формат, углекислый газ и аммиак.

Необходимо отметить, что большинство видов обнаруженных клостридий таксономи-

чески принадлежало к семейству Lachnospiraceae (Clostridium aminophilum, Clostridium bolteae, Clostridium lactatifermentans, Clostridium lavalense Clostridium colinum). Наряду с бактериями семейства Ruminococcaceae (Clostridium viride, Clostridium leptum) данные бактерии относятся к представителям целлюлозолитической микрофлоры, помогающей организму коров разлагать клетчатку и обеспечивать более эффективную усвояемость питательных веществ корма.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования удалось определить таксономическую принадлежность клостридий, традиционно присутствующих в большом количестве в рубце коров. Особенный интерес представляют как биохимические свойства обнаруженных видов клостридий, так и факт отсутствия патогенных возбудителей инфекционных анаэробных заболеваний (клостридиозов). Данное явление говорит о том, что патогенные клостридии в целом не являются условно-патогенными микроорганизмами, а их содержание может и должно быть скорректировано пробиотическими добавками и препаратами.

VARIETY OF CLOSTRIDIA FORMS IN THE RUMEN CONTENT OF MILKING COWS AND FINISHED COWS

Moiseeva K.A. - Postgraduate student of the Department of Microbiology, virology and immunology of FSBEI HE SPbSUVN, Tarlavin N.V. - Assistant of the Department of Epizootology, named V.P. Urban FSBEI HE SPbSUVN, V.V. Veretennikov - Assistant of the Department of Epizootology named V.P. Urban FSBEI HE SPbSUVN, A.A. Sukhinin - Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Microbiology, virology and immunology of the FSBEI HE SPbSUVN, Yildirim E.A. - Doctor of Biological Sciences, biotechnologist of the molecular genetic laboratory of LLC "Biotrof", Popova M.R. - laboratory assistant at the Department of Molecular Diagnostics at Explan LLC, Baimova R.R. - Laboratory assistant researcher at the Laboratory of Zoonanthropous Infections at the Pasteur Institute.

ABSTRACT

The article is devoted to the study of the bacterial composition of the rumen microbiome of cows in order to differentiate Clostridium bacteria in the

rumen contents, depending on the productivity and type of feeding. The research topic is relevant, since the rumen microbiome of cows directly affects the physiological parameters of both dairy herd and fattening cows. Some enterotoxin-producing gram-positive obligate anaerobic bacteria of the Clostridia class are often the cause of the development of histotoxic infections. However, it must be understood that most clostridia are not at all causative agents of infectious diseases, but are involved in metabolic processes in the rumen, contributing to the maintenance of vital activity and contributing to an increase in agricultural production. The NGS-sequencing method used in the study of the rumen microbiome of two groups of cows - fattening cows and dairy cows - has great diagnostic value. The results of the study are summarized in Table 1. The taxonomic affiliation of microorganisms to genus was determined using the RDP Classifier program (<http://rdp.cme.msu.edu/>). In the study of samples obtained from fattening cows, the most common representative of the Ruminococcaceae family, the bacterium Clostridium viride, the content of which reached 2.6% of all microorganisms found in the contents of the rumen of cows. This bacterium has ammonia, acetate, propionate, butyrate and valerate as fermentation products (depending on the growth substrate), which is of great importance for the physiological parameters of cattle, since it affects the growth and development of rumen villi. In samples obtained from dairy cows, the number of these bacteria reached 2.1% of all detected microorganisms.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пудовкин Д.Н., Щепеткина С.В., Карпенко Л.Ю., Ришко О.А. Болезни молодняка крупного рогатого скота: практические рекомендации (издание второе, дополненное). СПб. Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2019 г. – 204 с. с иллюстрациями.
2. Buckel, W., Janssen, P.H., Schuhmann, A. et al. Clostridium viride sp. nov., a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to Clostridium aminovalericum. Arch. Microbiol. 162, 387–394 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00282102>
3. Paster, B. J.; Russell, J. B.; Yang, C. M. J.; Chow, J. M.; Woese, C. R.; Tanner, R. (1993). "Phylogeny of the Ammonia-Producing Ruminant Bacteria Peptostreptococcus anaerobius, Clostridium sticklandii, and Clostridium aminophilum sp. nov". International Journal of Systematic Bacteriology. 43 (1): 107–110. doi:10.1099/00207713-43-1-107. ISSN 0020-

7713. PMID 8427801.

4.Durre, P., Andersch, W., and Andreesen, J.R. "Isolation and characterization of an adenine-utilizing, anaerobic sporeformer, *Clostridium purinolyticum* sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1981) 31:184-194.

5.Rychlik JL, Russell JB (2002). "The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyrovibriocin-like substance of *Butyrovibrio fibrisolvens* JL5 and monensin". *FEMS Microbiol Lett.* 209 (1): 93–8. doi:10.1111/j.1574-

6968.2002.tb11115.x

6.Krause, Denis O., and James B. Russell. "An rRNA approach for assessing the role of obligate aminacid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination." *Applied and Environmental Microbiology* 62.3 (1996): 815-821.

7.Houlihan AJ, Russell JB (2003). "The susceptibility of *Clostridium aminophilum* F to other antibiotics". *J Antimicrob Chemother.* 52 (4): 623–8. doi:10.1093/jac/dkg398.

УДК: 619: 611.13/66: 636.5

ИСТОЧНИКИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ЯЙЦЕВОДА У ГУСЯ ИТАЛЬЯНСКОГО

А.А Диких, соискатель кафедры анатомии, гистологии, физиологии, патологической анатомии ФГБОУ ВО «Омский ГАУ» имени П.А. Столыпина, Л.В. Фоменко, проф., докт-р вет. наук кафедры анатомии, гистологии, физиологии, патологической анатомии ФГБОУ ВО «Омский ГАУ» имени П.А. Столыпина.

Ключевые слова: яйцевод, артерии, сосуды, анастомоз, аорта. **Key words:** oviduct, arteries, vessels, anastomosis, aorta.



РЕФЕРАТ

Сосудистая система имеет значительную физиологическую лабильность для своевременного притока крови и наполнения стенок питательными веществами, поэтому функционирование яйцевода тесным образом связано с деятельностью кровеносных сосудов. Важная роль в этом принадлежит артериальной системе, которая выполняет транспортную, трофическую, гомеостатическую, защитную, экскреторную функции и газообмен. Целью наших исследований является изучение источников артериальной васкуляризации яйцевода у гуся итальянского. Объектами исследования служили тушки гуся итальянского (самки) в возрасте 160–180 суток в количестве 5 штук. У изученных видов птиц в васкуляризации яйцевода участвуют экстраорганные (краниальная, средняя и каудальная белковые, краниальные и каудальные маточные), магистральные (дорсальная и вентральная яйцеводные), и интраорганные (краниолатеральные правая и левая, каудовентральная, краниовентральная маточные) артерии. Артериальные сосуды участвуют в интенсивном кровоснабжении каждого отдела яйцевода, выполняющего строго определенные функции. Общий принцип васкуляризации яйцевода, как трубкообразного органа, заключается в том, что все артерии, вступающие с его дорсального края, участвуют в формировании дорсальной яйцеводной артерии, которая проходит параллельно его длинной оси, а по вентральному краю проходит вентральная яйцеводная артерия. От этих артерий отходят сосуды на латеральную поверхность яйцевода, охватывая его кольцеобразно и образуя между собой множество анастомозов.