

УДК 636

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.4.203

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРЕЧНЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПТИЦЫ

Прасолова О.В.1 – к.в.н., ведущий научный сотрудник (0000-0001-8924-2273), Малик Н.И.1 – д.б.н., главный научный сотрудник (ORCID 0000-0002-4695-1077; Солтынская И.В.1 – заведующий отделом (ORCID 0000-0002-6274-5265), Богомазова А.Н.1,2 – к.б.н., заведующий лабораторией (ORCID 0000-0003-1549-1984), Крылова Е.В.1 – к.б.н., ведущий научный сотрудник (ORCID 0000-0003-0080-0158), Малик Е.В. – к.в.н., ведущий научный сотрудник (ORCID 0000-0001-7836-3010)

1 ФГБУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов («ВГНКИ»), 2 ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА.

Ключевые слова: микробиом, метагеномное секвенирование, коллекционная деятельность.
Keywords: microbiome, metagenomic sequencing, collection activity



РЕФЕРАТ

Результаты метагеномного анализа выявили высокое филогенетическое и таксономическое разнообразие микробного сообщества как просветной, так и мукозной микрофлоры кишечного микробиома птицы. Анализ таксономической структуры сравниваемых микробиомов показал, как сходство, так и различия в таксономическом разнообразии и относительном обилии (%) бактерий сравниваемых микробиомов на уровне порядка, класса, рода.

На уровне типов в просветном и мукозном микробиоме кишечника птицы идентифицировано 24 таксономические категории, на уровне класса 35, на уровне порядка 75, на уровне семейства 168, на уровне рода – 350.

Основную долю микробного сообщества просветного и мукозного микробиома составляли микроорганизмы, относящиеся к типам Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria и Bacteroidetes. Сравнение биологического разнообразия толстокишечного и мукозного микробиомов на уровне филума показало, что относительная величина Proteobacteria по отношению к Firmicutes в мукозном микробиоме было в 3,25 раза выше, а соотношение Firmicutes к Bacteroidetes в толстокишечном микробиоме в 3,98 раза выше, чем в мукозном.

На уровне рода различия в составе микробиомов проявились большей относительной долей (по убывающей) в просветном микробиоме представителей рода Lactobacillus, Candidatus Arthromitus, Romboutsia, Gallibacterium, Campylobacter, Enterococcus, и представителей рода Acinetobacter, Staphylococcus, Bacillus и Bradyrhizobium в мукозном.

Углублённое изучение кишечной микробиоты с использованием приемов культивирования и высокотехнологичных методов идентификации микроорганизмов с учетом результатов метагеномного анализа позволяет значительно расширить представление о видовом многообразии микробиомов и функциях представителей различных таксонов в поддержании здоровья птицы, а также для формирования перечня представителей нормальной микрофлоры птицы.

ВВЕДЕНИЕ

Нормальная микрофлора представляет собой качественное и количественное соотношение разнообразных популяций микробов отдельных органов и систем, поддерживающее биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие, необходимое для сохранения здоровья животных [1-3]. Важнейшей функцией микрофлоры является ее участие в формировании резистентности организма различным болезням и обеспечение предотвращения колонизации организма человека посторонними микроорганизмами.

Птицеводство является одной из самых быстрорастущих отраслей в мире. Однако несмотря на резкую активизацию исследований в области изучения кишечного микробиома промышленной птицы, ряд вопросов до настоящего времени все ещё остаётся нерешённым, среди них различия таксономического состава микробиоценозов на уровне типов и родов в различных отделах кишечника, влияние медикаментозной нагрузки на структуру кишечного микробиома и ряд других вопросов, связанных с пониманием взаимодействия между характером изменений в структуре кишечного микробиома и риском развития микробиом-ассоциированных болезней птицы и возникновению резистентности [4-6].

В этой связи диагностика состояния нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы с целью разработки и осуществления мер по ее сохранению или восстановлению, является актуальной задачей ветеринарной медицины, обозначенной в № 492-ФЗ “О биологической безопасности в Российской Федерации”. Формирование коллекции представителей нормальной микрофлоры человека и сельскохозяйственных животных регламентировано Постановлением правительства РФ от 16.04.2022 №676.

Для оценки таксономического разнообразия микробных сообществ наряду с микробиологическими техниками изучения микробиома на экосистемном уровне

широко используются метагеномные технологии секвенирования, основанные на полиморфизме длин терминальных рестрикционных фрагментов генов 16S рРНК, в том числе и для изучения биологической и экологической роли кишечного микробиома с точки зрения видового состава, разнообразия и структуры сообществ и дают возможность на описательном уровне выявить некультивируемые члены кишечных микробиомов. [7-9] В этой связи разработка и осуществления мер по сохранению или восстановлению нормальной кишечной микробиоты неразрывно связана как с селекцией представителей нормальной кишечной микрофлоры с действенными пробиотическими свойствами микробиологическими методами, так и изучением влияния пробиотиков на микробиоту птиц методом метагеномного анализа [10-11].

В связи с вышеизложенным, диагностика состояния нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы микробиологическими методами и методами метагеномного анализа в сравнительном аспекте и создание коллекции представителей нормальной кишечной микрофлоры птицы является актуальной и своевременной задачей, которая может потенциально способствовать разработке новых терапевтических стратегий для модуляции состава микробиомов в плане воздействия на здоровье животных для борьбы с глобальным бременем неинфекционных заболеваний и устойчивым производством безопасных и качественных белковых продуктов в питании человека.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: формировать перечень представителей нормальной микрофлоры птицы с помощью современных молекулярно-генетических технологий

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы для исследований были отобраны от кур породы белый леггорн в возрасте 90 дней, не получавших антибиотиков, выращенных в виварии с контролируемой подачей воздуха в индивидуальных клетках, исключающих групповой контакт. Образцы кормов проверя-

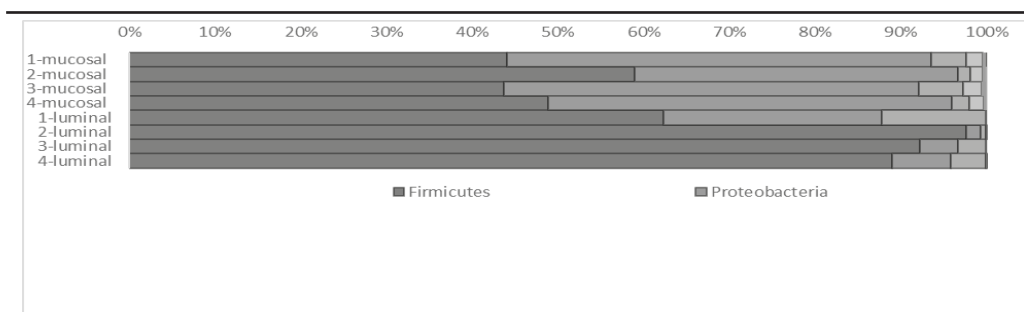


Рисунок 1. Филогенетический профиль просветного (luminal) и мукозного (mucosal) микробиома птицы на уровне типа.

Таблица 1
Количественные результаты исследования филогенетического профиля на уровне типа

Тип микроорганизма	Мукозный микробиом % reed, $\pm$ SEM	Просветный микробиом % reed, $\pm$ SEM
<i>Firmicutes</i>	48,84 $\pm$ 3,57	85,23 $\pm$ 7,85
<i>Proteobacteria</i>	45,70 $\pm$ 2,72	9,62 $\pm$ 5,38
<i>Epsilonbacteraeota</i>	3,13 $\pm$ 0,87	5,05 $\pm$ 2,51
Bacteria, unclassified	1,80 $\pm$ 0,14	0,01
Reed, unclassified	0,30 $\pm$ 0,07	0
Bacteroidetes	0,14 $\pm$ 0,04	0
Actinobacteria	0,06 $\pm$ 0,04	0
Cyanobacteria	0,04	0,05 $\pm$ 0,01
Patiscibacteria	0	0,03 $\pm$ 0,02

лись на наличие антибиотиков. Образцы содержимого толстого отдела кишечника и муцинового слоя получали сразу после забоя птицы методом цервикальной дислокации.

Выделение ДНК из метагеномных образцов осуществляли с помощью наборов QIAamp DNA Microbiome Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Проверку качества выделенной ДНК проводили методом электрофореза в 0,8 % агарозном геле, а также с использованием системы микрокассетного электрофореза TapeStation 4200. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Quantus (Promega). Подготовка ДНК-библиотеки проведена согласно протоколу «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» с использованием набора реактивов NexteraXT. Для секвенирова-

ния использован набор реактивов MiSeq Reagent Kit v3, обеспечивающий получение прочтений длиной 300 нуклеотидов. Для анализа данных секвенирования 16S рРНК использовался пакет программ QIIME2 и протокол DADA2. Для определения таксономического состава использовался наивный байесовский классификатор, обученный на базе данных последовательностей рибосомных генов Silva. Бактерии, представленные в количестве менее 1% от среднего количества ампликонов на образец, были исключены.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе нашей работы бы проанализирован большой массив данных от каждого образца в отдельности. Результаты метагеномного анализа выявили высокое филогенетическое и таксономическое разнообразие микробного сообщества как

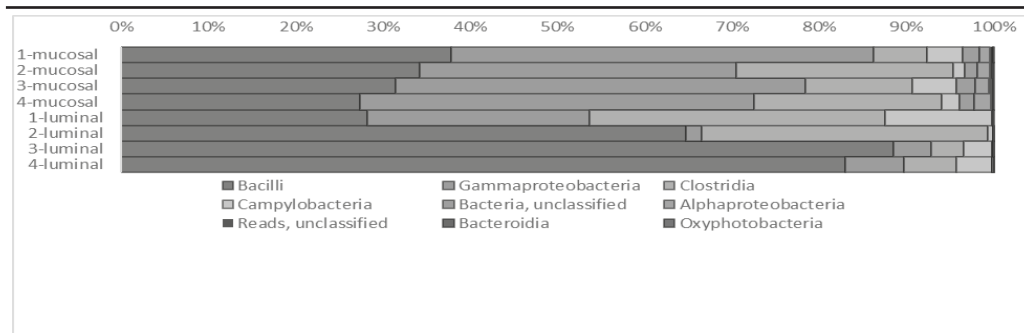


Рисунок 2. Филогенетический профиль просветного (luminal) и мукозного (mucosal) микробиома птицы на уровне класса

Таблица 2
Количественные результаты исследования филогенетического профиля на уровне класса

Класс микроорганизма	Мукозный микробиом, % reed , ±SEM	Просветный микробиом, % reed ±SEM
<i>Bacilli</i>	32,68 ± 2,21	66,05 ± 13,63
<i>Clostridia</i>	16,16 ± 4,27	19,09 ± 8,23
<i>Gammaproteobacteria</i>	44,20 ± 2,72	9,52 ± 5,37
<i>Campylobacteria</i>	3,13 ± 0,87	5,05 ± 2,51
<i>Bacteria, unclassified</i>	1,80 ± 0,14	0,01
<i>Alphaproteobacteria</i>	1,50 ± 0,15	0,10 ± 0,03
<i>Reed, unclassified</i>	0,30 ± 0,07	0
<i>Bacteroidia</i>	0,14 ± 0,04	0
<i>Actinobacteria</i>	0,06 ± 0,04	0
<i>Oxyphotobacteria</i>	0,04	0,05 ± 0,01
<i>Negativicutes</i>	0	0,09 ± 0,08
<i>Saccharimonadia</i>	0	0,03 ± 0,02

просветной, так и мукозной микрофлоры кишечного микробиома птицы. Анализ таксономической структуры сравниваемых микробиомов показал, как сходство, так и различия в таксономическом разнообразии и относительном обилии (%) бактерий сравниваемых микробиомов на уровне порядка, класса, рода и вида.

На уровне типов в просветном и мукозном микробиоме кишечника птицы идентифицировано 24 таксономические категории.

Основную долю микробного сообщества просветного и мукозного микробиома составляли микроорганизмы, относящиеся к типам *Firmicutes*, *Proteobacteria*,

Actinobacteria *Cyanobacteria* и *Bacteroidetes* (рис.1, табл.1).

Сравнение биологического разнообразия толстокишечного и мукозного микробиомов на уровне типа показало, что относительная величина *Proteobacteria* по отношению к *Firmicutes* в мукозном микробиоме было в 3,25 раза выше, а соотношение *Firmicutes* к *Bacteroidetes* в толстокишечном микробиоме в 3,98 раза выше, чем в мукозном.

Возможно, относительное доминирование фила *Proteobacteria* в сравнении с *Firmicutes* в муциновом слое, связано с различными функциональными активностями представителей этих таксонов. В

Таблица 3

Количественные результаты исследования филогенетического профиля
на уровне порядка

Порядок	Мукозный микробиом , % reed $\pm$ SEM	Просветный микробиом, % reed, $\pm$ SEM
Lactobacillales	3,67 $\pm$ 1,26	65,31 $\pm$ 13,68
Clostridiales	16,16 $\pm$ 4,27	19,09 $\pm$ 8,23
Pseudomonadales	43,57 $\pm$ 2,68	1,22 $\pm$ 0,07
Bacillales	29,01 $\pm$ 2,14	0,74 $\pm$ 0,09
Campylobacteriales	3,13 $\pm$ 0,87	5,05 $\pm$ 2,51

частности, основные метаболические активности Firmicutes связаны с углеводным обменом с биосинтезом и метаболизмом кофакторов и витаминов, липидов, ферментов, аминокислот и глюкозы, тогда *Proteobacteria* участвуют в метаболизме нуклеотидов и энергетическом обмене, оказывая влияние на созревание и дифференциацию муцина и кооптацию с иммунокомпетентными клетками слизистой кишечника.

На уровне класса в просветном и мукозном микробиоме кишечника птицы идентифицировано 35 таксономических категорий. На уровне класса характерные различия в таксономическом составе сравниваемых микробиомов на уровне класса из числа 8 топовых категорий проявились большей относительной долей представителей класса *Bacilli* и *Clostridia* в составе просветного микробиома и значительным преобладанием доли *Gammaproteobacteria* в составе мукозного микробиома (рисунок 2, таблица 2).

На уровне порядка в микробиоме кишечника птицы идентифицировано 75 таксономических категорий, в просветном микробиоме преобладала относительная доля бактериальных линий порядка *Lactobacillales*, за которой следовали *Clostridiales*, *Pasteurellales*, тогда как в мукозном микробиоме - *Bacillales*, *Pseudomonadales*, *Lactobacillales*, основные из которых представлены в таблице 3.

На уровне семейства в просветном и мукозном микробиоме кишечника птицы идентифицировано 168 таксономических категорий. Из числа топовых линий относительное обилие *Lactobacillaceae* *Clos-*

tridiaceae *Pasteurellaceae* *Campylobacteraceae* в просветном микробиоме было выше по сравнению чем в мукозном, тогда как в составе мукозного микробиома преобладали представители семейства *Moraxellaceae* *Bacillaceae* *Clostridiaceae* *Staphylococcaceae*. Интересно отметить, что представители семейств *Bacillaceae* и *Bradyrhizobiaceae* не относились к топовым семействам просветной микрофлоры кишечника птицы, а представители семейства *Pasteurellaceae* – к топовым мукозного микробиома (таблица 4).

На уровне рода в микробиоме кишечника птицы идентифицировано 350 таксономических категорий (таблица 5).

На уровне рода различия в составе микробиомов проявились большей относительной долей (по убывающей): в просветном микробиоме представителей рода *Lactobacillus*, *Candidatus* *Arthromitus*, *Romboutsia*, *Gallibacterium*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, в мукозном микробиоме представителей рода *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus* и *Bradyrhizobium*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия кишечной микробиоты - ценный инструмент при разработке новых биологических технологий, в том числе кормовых добавок и лекарственных препаратов, нормализующих микробиоту. Выделение чистых культур микроорганизмов и их исследование необходимо для создания коллекции представителей нормальной микрофлоры, с целью разработки средств профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями нормальной микробиоты. Применение метагеномного

Таблица 4

Количественные результаты исследования филогенетического профиля
на уровне семейства

Семейство	Мукозный микробиом, % reed $\pm$ SEM	Просветный микробиом, % reed, $\pm$ SEM
Lactobacillaceae	2,59 $\pm$ 1,33	63,80 $\pm$ 14,60
Moraxellaceae	43,57 $\pm$ 2,68	1,22 $\pm$ 0,07
Staphylococcaceae	20,88 $\pm$ 2,13	0,55 $\pm$ 0,08
Clostridiaceae	15,72 $\pm$ 4,62	10,90 $\pm$ 6,43
Bacillaceae	8,13 $\pm$ 0,46	0,19 $\pm$ 0,02
Campylobacteraceae	3,08 $\pm$ 0,84	4,83 $\pm$ 2,37

Таблица 5

Количественные результаты исследования филогенетического профиля
на уровне рода

Род	Мукозный микробиом, % reed $\pm$ SEM	Просветный микробиом, % reed, $\pm$ SEM
Lactobacillus	2,59 $\pm$ 1,33	63,80 $\pm$ 14,60
Acinetobacter	43,57 $\pm$ 2,68	1,21 $\pm$ 0,07
Staphylococcus	20,84 $\pm$ 2,12	0,55 $\pm$ 0,08
Candidatus Arthromitus	15,71 $\pm$ 4,61	10,82 $\pm$ 6,41
Bacillus	8,13 $\pm$ 0,46	0,19 $\pm$ 0,02
Campylobacter	3,08 $\pm$ 0,84	4,83 $\pm$ 2,37

секвенирования не исключает использование методов классической микробиологии, а только дополняет их с целью оценки биологического разнообразия кишечной микробиоты, не поддающейся микробиологическим техникам культивирования.

Углублённое изучение кишечной микробиоты с использованием приемов культивирования и высокотехнологичных методов идентификации микроорганизмов с учетом результатов метагеномного анализа позволяет значительно расширить представление о видовом многообразии микробиомов и функциях представителей различных таксонов в поддержании здоровья птицы, а также для формирования переписи представителей нормальной микрофлоры птицы.

Исследование финансировалось Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору, научно-исследовательский проект №122012700127-9 «Диагностика состоя-

ния нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственной птицы под воздействием антимикробных и пробиотических препаратов для разработки и осуществления мер по ее сохранению или восстановлению».

MODERN MOLECULAR GENETIC TECHNOLOGIES FOR FORMING A LIST OF REPRESENTATIVES NORMAL BIRD MICROFLORA

Prasolova O.V.1 Malik N.I.1, Soltynskaya I.V.1, Bogomazova A.N.1,2, Krylova E.V.1, Malik E.V.1

1-The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 2- Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine

ABSTRACT

The results of the metagenomic analysis revealed a high phylogenetic and taxonomic diversity of the microbial community of both luminal and mucosal microflora of the bird intestinal microbiome. Analysis of the taxonomic structure of the compared micro-

omes showed both similarities and differences in the taxonomic diversity and relative abundance (%) of bacteria of the compared microbiomes at the level of order, class, genus.

At the type level, 24 taxonomic categories were identified in the luminal and mucosal intestinal microbiome of birds, at the class level 35, at the order level 75, at the family level 168, at the genus level 350.

The main share of the microbial community of the luminal and mucosal microbiome was made up of microorganisms belonging to the Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria Cyanobacteria, and Bacteroidetes phyla. Comparison of the biological diversity of the colonic and mucosal microbiomes at the phylum level showed that the relative value of Proteobacteria in relation to Firmicutes in the mucosal microbiome was 3.25 times higher, and the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes in the colonic microbiome was 3.98 times higher. than in mucosal.

At the genus level, differences in the composition of microbiomes were manifested by a greater relative share (in decreasing order) in the luminal microbiome of representatives of the genus *Lactobacillus*, *Candidatus Arthromitus*, *Romboutsia*, *Gallibacterium*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, and representatives of the genus *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Bradyrhizobium* in the mucosal microbiome. An in-depth study of the intestinal microbiota using cultivation techniques and high-tech methods for identifying microorganisms, taking into account the results of metagenomic analysis, can significantly expand the understanding of the species diversity of microbiomes and the functions of representatives of various taxa in maintaining bird health, as well as to form a census of representatives of normal bird microflora.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1.van den Berg, N.I., Machado, D., Santos, S. et al. Ecological modelling approaches for predicting emergent properties in microbial communities. *Nat Ecol Evol* 6, 855–865 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01746-7>
2.Cuccato, M.; Rubiola, S.;Giannuzzi, D.;

Grego, E.; Pregel, P.;Divari, S.; Cannizzo, F.T. 16S rRNA Sequencing Analysis of the Gut Microbiota in Broiler Chickens Prophylactically Administered with Antimicrobial Agents. *Antibiotics* 2021, 10, 146. <https://doi.org/antibiotics10020146>

3.Xiao, S.-S.; Mi, J.-D.; Mei, L.; Liang, J.; Feng, K.-X.;Wu, Y.-B.; Liao, X.-D.;Wang, Y. Microbial Diversity and Community Variation in the Intestines of Layer Chickens *Animals* 2021, 11, 840.

4.Lenkova T., Nikonov I., Kuznetsov Y., Karpenko I., Balykina A., Development of the probiotic feed supplement based on *Lactobacillus plantarum* to increase the broiler productivity, *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)* ISSN: 2278-3075 (Online), Volume-9 Issue-1, November 2019

5.Cao, J., Hu, Y., Liu, F. et al. Metagenomic analysis reveals the microbiome and resistance in migratory birds. *Microbiome* 8, 26 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0781-8>;

6.Dmitry A. Makarov, Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia / Dmitry A. Makarov, Olga E. Ivanova, Anastasia V. Pomazkova, Maria A. Egoreva, Olga V. Prasolova, Sergey V. Lenev, Maria A. Gergel, Nataliya K. Bukova, Sergey Yu. Karabanov // *Veterinary World*, 15(3): 611-621, DOI: 10.14202/vetworld.2022.611-621;

7.Mohd Shaufi, M.A., Sieo, C.C., Chong, C.W. et al. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog* 7, 4 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0051-7>

8.Mulholland, K.A.; Robinson, M.G.; Keeler, S.J.; Johnson, T.J.; Weber, B.W.; Keeler, C.L., Jr. Metagenomic Analysis of the Respiratory Microbiome of a Broiler Flock from Hatching to Processing. *Microorganisms* 2021, 9, 721. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040721>

9.Ahir V, Koringa P, Bhatt V, Ramani U, Tripathi A, Singh K, Dhagat U, Patel J, Patel M, Katudia K. Metagenomic analysis of poultry gut microbes. *Indian J Poultry Sci.* 2010;45(2):111–4.

10. Oakley BB, Kogut MH. Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. *Front Vet Sci*. 2016;3:11.
11. Awad WA, Mann E, Dzieciol M, Hess C, Schmitz-Esser S, Wagner M, Hess M. Age-related differences in the luminal and mucosa-associated gut microbiome of broiler chickens and shifts associated with campylobacter jejuni infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:154.
- REFERENCES**
1. van den Berg, N.I., Machado, D., Santos, S. et al. Ecological modeling approaches for predicting emergent properties in microbial communities. *Nat Ecol Evol* 6, 855–865 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01746-7>
2. Cuccato, M.; Rubiola, S.; Giannuzzi, D.; Grego, E.; Pregel, P.; Divari, S.; Cannizzo, F.T. 16S rRNA Sequencing Analysis of the Gut Microbiota in Broiler Chickens Prophylactically Administered with Antimicrobial Agents. *Antibiotics* 2021, 10, 146. <https://doi.org/antibiotics10020146>
3. Xiao, S.-S.; Mi, J.-D.; Mei, L.; Liang, J.; Feng, K.-X.; Wu, Y.-B.; Liao, X.-D.; Wang, Y. Microbial Diversity and Community Variation in the Intestines of Layer Chickens. *Animals* 2021, 11, 840.
4. Lenkova T., Nikonov I., Kuznetsov Y., Karpenko I., Balykina A., Development of the probiotic feed supplement based on *Lactobacillus plantarum* to increase the broiler productivity, *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)* ISSN: 2278-3075 (Online), Volume-9 Issue-1, November 2019
5. Cao, J., Hu, Y., Liu, F. et al. Metagenomic analysis reveals the microbiome and resistome in migratory birds. *Microbiome* 8, 26 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0781-8>;
6. Dmitry A. Makarov, Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia / Dmitry A. Makarov, Olga E. Ivanova, Anastasia V. Pomazkova, Maria A. Egoreva, Olga V. Prasolova, Sergey V. Lenev, Maria A. Gergel, Nataliya K. Bukova, Sergey Yu. Karabanov // *Veterinary World*, 15(3): 611-621, DOI: 10.14202/vetworld.2022.611-621;
7. Mohd Shaufi, M.A., Sieo, C.C., Chong, C.W. et al. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog* 7, 4 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0051-7>
8. Mulholland, K.A.; Robinson, M. G.; Keeler, S.J.; Johnson, T. J.; Weber, B. W.; Keeler, C.L., Jr. Metagenomic Analysis of the Respiratory Microbiome of a Broiler Flock from Hatching to Processing. *Microorganisms* 2021, 9, 721. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040721>
9. Ahir V, Koringa P, Bhatt V, Ramani U, Tripathi A, Singh K, Dhagat U, Patel J, Patel M, Katudia K. Metagenomic analysis of poultry gut microbes. *Indian J Poultry Sci*. 2010;45(2):111–4.
10. Oakley BB, Kogut MH. Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. *Front Vet Sci*. 2016;3:11.
11. Awad WA, Mann E, Dzieciol M, Hess C, Schmitz-Esser S, Wagner M, Hess M. Age-related differences in the luminal and mucosa-associated gut microbiome of broiler chickens and shifts associated with campylobacter jejuni infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:154.