

АНАЛИЗ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОБИОМА ИЗ СЛЕПЫХ ОТРОСТКОВ КИШЕЧНИКА ПРОМЫШЛЕННЫХ СВИНЕЙ

Ю.А. ЛЫСЕНКО^{1,2}, А.Г. КОЩАЕВ², В.А. БЕЛЯК²,
А.В. ЛУНЕВА¹, Е.Ю. МАРЧЕНКО¹

(¹Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева
²Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина)

*В статье представлены данные по использованию современных методов анализа, выделению и идентификации представителей микробиоценоза слепых отростков кишечника промышленных свиней, выращиваемых по интенсивной технологии. Для изучения состава микрофлоры различных таксономических групп в химусе промышленных свиней был использован бактериальный метагеномный анализ. Для выделения доминирующих представителей рода *Lactobacillus* применялись классические микробиологические методы исследования. Идентификация пробиотически значимых культур микроорганизмов осуществлялась с применением масс-спектрометрического анализа на MALDI-TOF MS в спектрометре VastoSCREEN, а также дополнительно путем определения нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК. Проводилось полногеномное секвенирование выделенных превалирующих чистых культур рода *Lactobacillus*. В результате исследований установлено, что в слепых отростках кишечника поросят-сосунков, свиней на доращивании и откорме наблюдается многообразие состава микробных сообществ, которое с возрастом в количественном соотношении меняется. Результаты масс-спектрометрического анализа выявили наличие белковых спектров важных представителей бактерий рода *Lactobacillus*. Из них доминировали два вида *Lactobacillus amylovorus* и *Limosilactobacillus micosae*, которые дополнительно были подтверждены путем анализа их нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК и при проведении полногеномного секвенирования.*

Ключевые слова: микрофлора кишечника, свиньи, выделение, идентификация, метагеномный анализ, желудочно-кишечный тракт, пробиотик, масс-спектрометрия, лактобактерии, нуклеотидная последовательность.

Введение

Внедрение пробиотиков в программы профилактики заражения животных условно-патогенными микроорганизмами является многообещающим подходом [12, 24]. Причина этого – их пролонгированное действие в поддержании благоприятного консорциума микроорганизмов в составе просвета и слизистой желудочно-кишечного тракта животных. Как потенциальная замена антибиотиков, пробиотики полезны для улучшения иммунной функции хозяина и уменьшения возникновения кишечных заболеваний в животноводстве [9, 25]. Пробиотические агенты в составе препаратов имеют потенциал к предотвращению либо снижению агрессивного влияния условно-патогенной микрофлоры, риск попадания в организм которой с кормом довольно велик [2, 17, 18]. Кроме того, нельзя забывать о фактической способности пробионтов влиять на колонизацию бактерий в определенных частях слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, а также на секрецию органических кислот, пищеварительных ферментов и биоактивных пептидов [6, 15, 20].

Современные тенденции скрининга потенциальных штаммов-пробионтов сосредоточены в основном на решении вопроса о том, обладают ли штаммы антибактериальной функцией. В последующем встает вопрос о влиянии их на конверсионные показатели

организма животных, поэтому весьма важным является поиск различных биологических активностей молочнокислых бактерий, которые обладают различным пробиотическим потенциалом [23]. В этой связи поиск новых перспективных автохтонных штаммов-пробионтов на сегодняшний день является многообещающим направлением.

Цель исследований: выделение и идентификация представителей микробиоценоза слепых отростков кишечника промышленных свиней, выращиваемых по интенсивной технологии, с использованием современных методов анализа.

Материал и методы исследований

Лабораторные исследования осуществлялись на базе структурных подразделений Кубанского ГАУ – научно-испытательного центра токсико-фармакологических исследований и разработки лекарственных средств ветеринарного применения, кормовых добавок и дезинфектантов (НИЦ Ветфармбиоцентр), центра молекулярно-генетических исследований в АПК и центра биотехнологии, а также на кафедре биотехнологии, биохимии и биофизики.

Проведение метагеномного анализа микробных сообществ и их соотношения в желудочно-кишечном тракте свиней осуществляли согласно данным источников научной литературы [7].

Состав доминирующей полезной микрофлоры рода *Lactobacillus* в содержимом слепых отростков кишечника промышленных свиней определяли и выделяли общепринятыми микробиологическими методами исследований [1, 4].

Идентификация бактериальных штаммов осуществлялась по показателям спектров рибосомальных белков на MALDI-TOF MS (спектрометр VactoSCREEN) и при автоматическом сопоставлении их с уже имеющимися данными в базе VactoSCREEN [8, 14].

Дополнительно осуществлялась идентификация превалирующих чистых культур путем определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК согласно данным [3, 5, 11, 13].

Полногеномное секвенирование выделенных превалирующих чистых культур микроорганизмов и таксономическую принадлежность изолятов осуществляли по методикам [16, 19, 21, 22, 26, 27].

Результаты и их обсуждение

Метагеномный анализ микробных сообществ и их соотношение в химусе слепых отростков кишечника свиней. Результаты количественного анализа представленности таксономических групп микроорганизмов в слепых отростках кишечника свиней различных технологических групп отражены на рисунках 1–4.

В результате метагеномного анализа внутреннего содержимого слепых отростков кишечника (химуса) промышленных свиней, содержащихся при интенсивной системе откорма, были получены данные, отражающие корреляцию процентного содержания тех или иных систематических групп микроорганизмов. Исследованию подверглись образцы химуса свиней трех хозяйственно-технологических групп: сосунов (S1), доращивания (S2) и откорма (S3).

У поросят на грудном вскармливании (сосунов) выявлено преобладание типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* – 79,3%; 10,7%; 6,4% соответственно. Преобладающими классами оказались *Clostridia*, *Bacilli*, *Bacteroidia* – 10,0%; 35,7%; 47,8%. Также в соответствии с систематикой превалировали отряды *Clostridiales*, *Lactobacillales*, *Bacteroidales* в соотношении 42,1%; 35,0%; 10,0% и роды *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Prevotella* (51,4%; 5,7%; 3,4%).

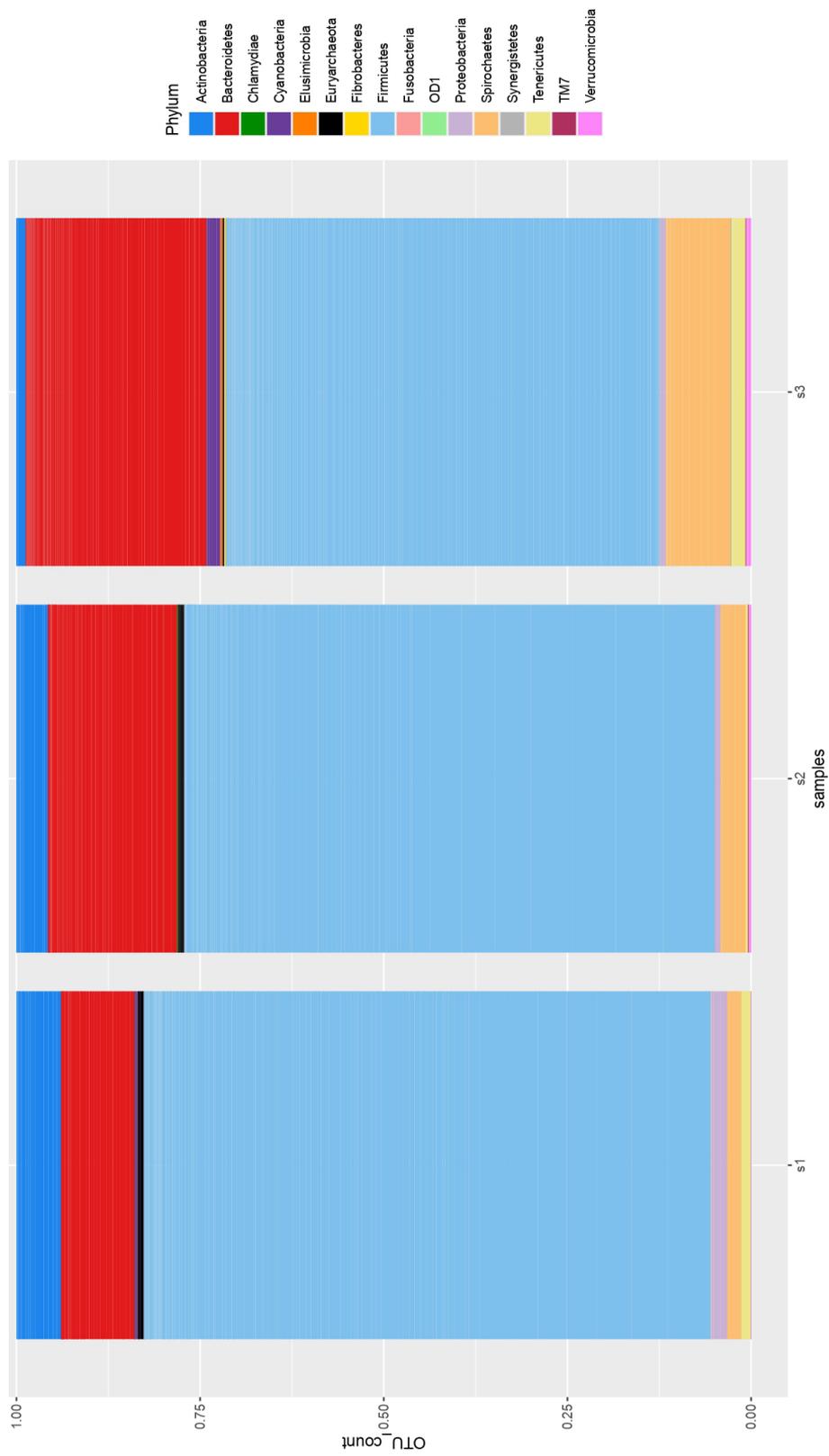


Рис. 1. Бактериальный состав слепого отростка кишечника свиной: s1 – поросят на доращивании; s2 – поросят на доращивании; s3 – свиная на откорме – на уровне филы

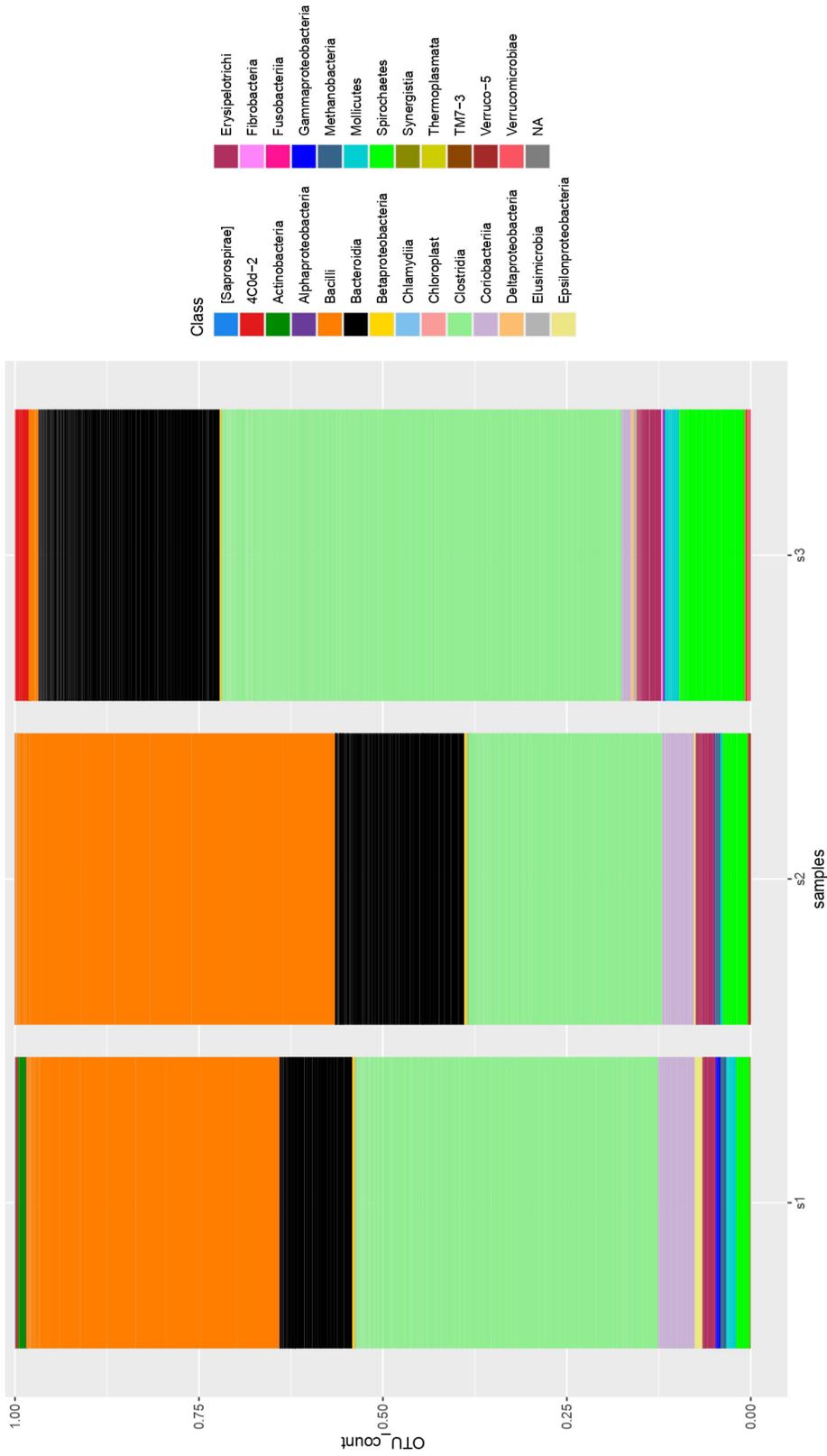


Рис. 2. Бактериальный состав слепого отростка кишечника свиной: s1 – поросенок-сосун; s2 – поросенок на дорашивании; s3 – свишня на откорме – на уровне класса

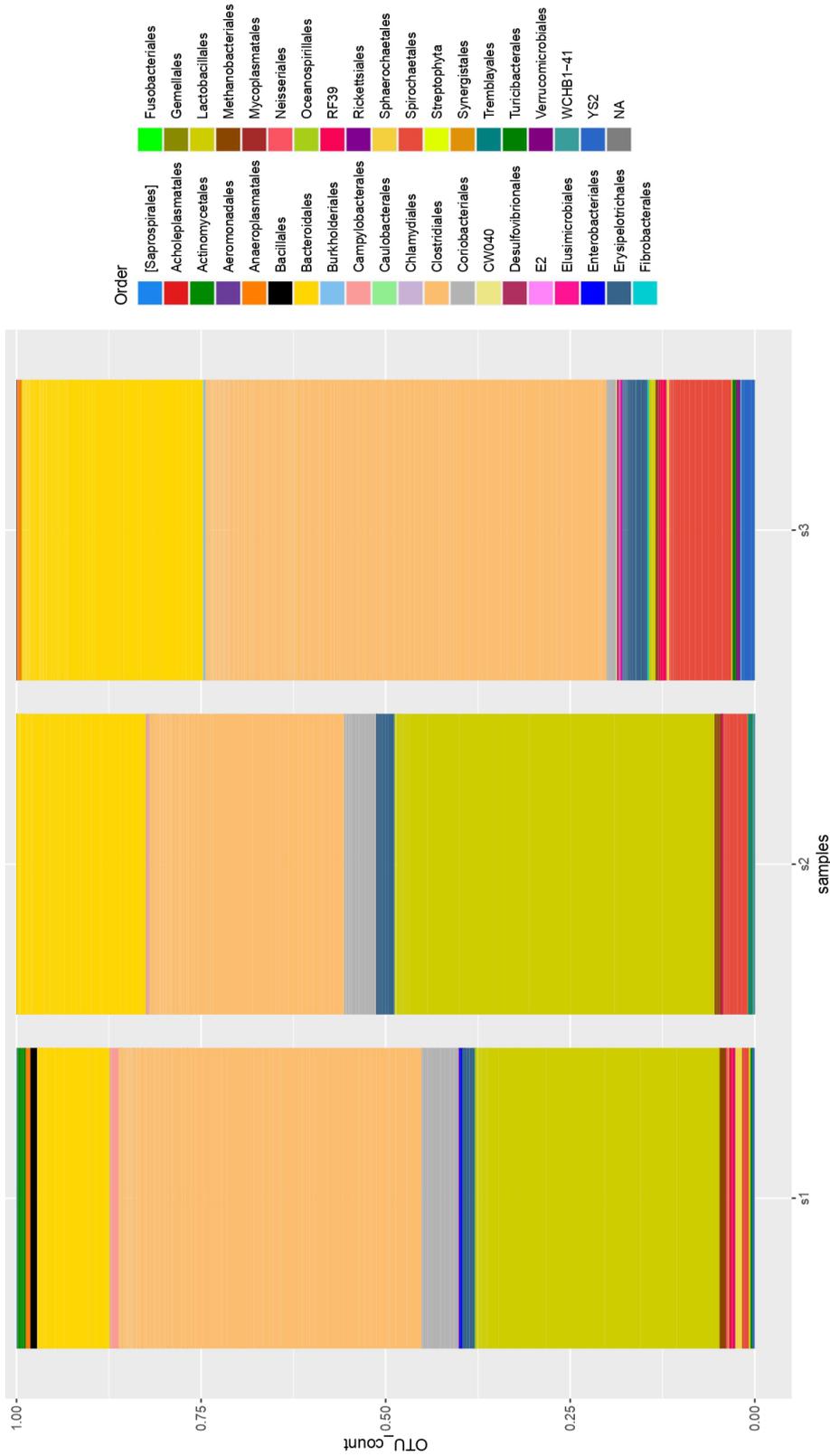


Рис. 3. Бактериальный состав слепого отростка кишечника свиной: s1 – поросенок-сосун; s2 – поросенок на доращивании; s3 – свишня на откорме – на уровне отряда

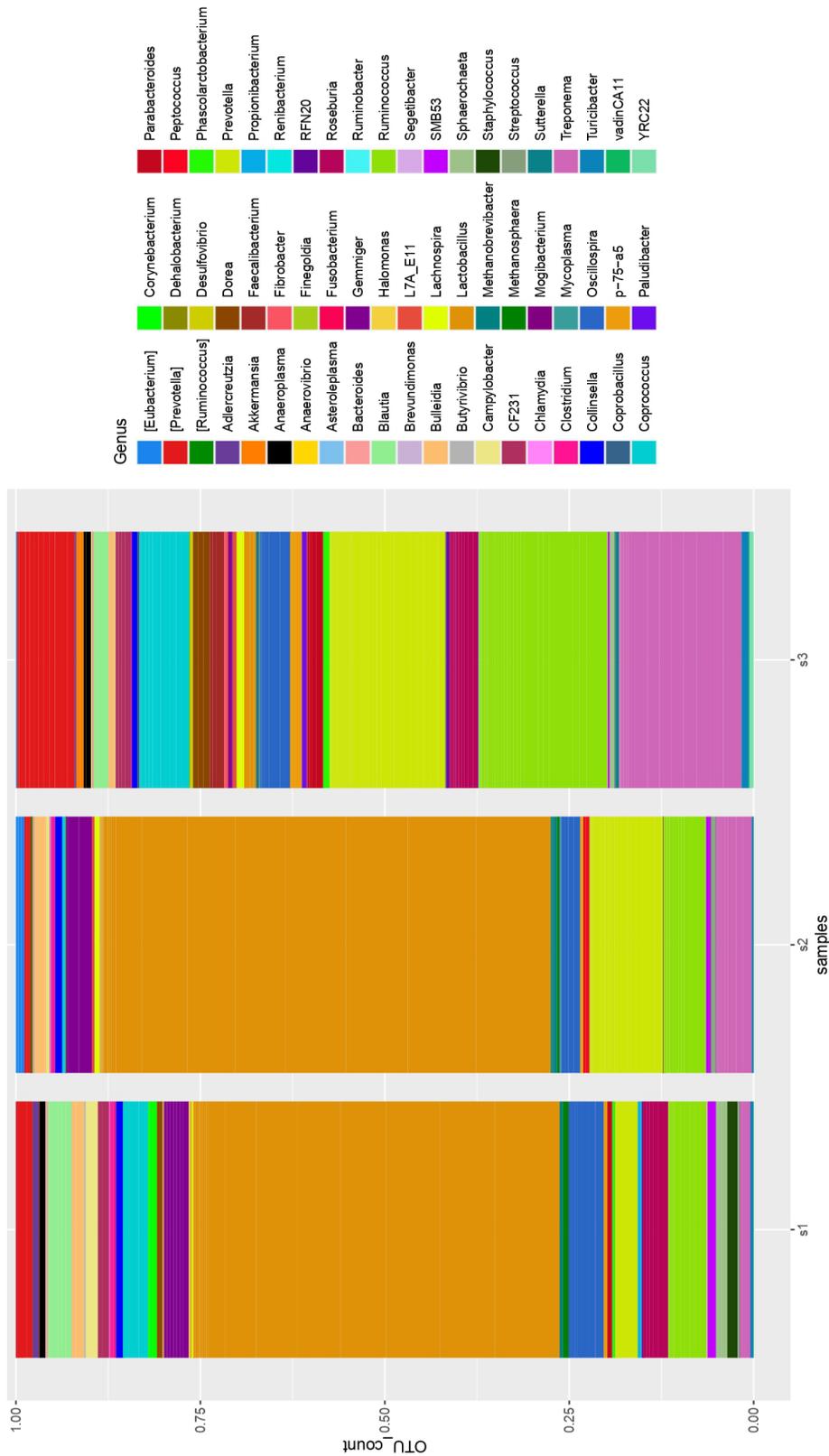


Рис. 4. Бактериальный состав слепого отростка кишечника свиной: s1 – поросенок-сосун; s2 – поросенок на дорашивании; s3 – свинья на откорме – на уровне рода

В исследуемых образцах хозяйственно-технологической группы доращивания вариация типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* составила, соответственно, 74,2%; 17,8%; 4,2%. Аналогичные первой исследуемой группе животных классы составили 23,5%; 45%; 17,8%. В данной группе свиней преобладали аналогичные первой группе отряды, имеющие показатели 26,7%; 0,7%; 18,0% и роды с показателями 62,8%; 5,7%; 10,2% соответственно.

В группе свиней на откорме в процентном соотношении аналогичные показатели первых двух групп составили: типы *Firmicutes* (60,7%), *Bacteroidetes* (27,1%), *Actinobacteria* (1,4%); классы *Clostridia* (56,4%), *Bacilli* (2,1%), *Bacteroidia* (25,7%); отряды *Clostridiales* (56,4%), *Latobacillales* (0,7%), *Bacteroidales* (25,2%); роды *Lactobacillus* (4,2%), *Ruminococcus* (18,5%), *Prevotella* (16,4%).

Выделение и идентификация штаммов-изолятов превалирующих чистых культур рода Lactobacillus. Классическими микробиологическими методами были выделены 6 штаммов-изолятов молочнокислых бактерий.

Для дальнейшей идентификации цельноклеточные бактерии помещали на плашку-мишень MALDI-TOF MS и их масс-спектры снимали в спектрометре VastoSCREEN с использованием прилагающегося программного обеспечения (фирма «Литех», Россия), позволяющего проводить кластерный и корреляционный анализ с возможностью субтипирования микроорганизмов [8, 10, 14].

В результате масс-спектрометрического анализа были получены белковые спектры, которые относились к следующим бактериям: *Lactobacillus amylovorus*; *Limosilactobacillus mucosae*; *Lactobacillus johnsoni*; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus corineformis*. Среди них превалирующую часть составляли *Lactobacillus amylovorus* и *Limosilactobacillus mucosae*, которые в перспективе вошли в состав новой микробной кормовой добавки для применения в рационе свиней.

Для подтверждения видовой принадлежности выделенных микроорганизмов дополнительно проводился анализ их нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Результаты анализа представлены в таблице 1.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей было однозначно установлено, что выделенные лактобактерии, действительно, относятся к *Lactobacillus amylovorus* и *Limosilactobacillus mucosae*. Для *Limosilactobacillus mucosae* установлена гомология с ближайшим типовым штаммом DSM 13345, и сходство составило >100,0%; у *Lactobacillus amylovorus* аналогичный показатель составил >99,5%, что дает подтверждение видовой принадлежности изучаемых штаммов бактерий.

Полногеномное секвенирование превалирующих видов лактобактерий. Выделение ДНК из чистой культуры. Суспензию жидкой культуры молочнокислых бактерий центрифугировали на приборе MiniSpin («Eppendorf», Германия) при 14000 об/мин в течение 5 мин. Бактериальный осадок использовали для выделения ДНК с использованием набора DNeasy® Blood & Tissue kit («QIAGEN», Германия) согласно протоколу разработчика. Качество и количество выделенной ДНК, а также подготовленных библиотек были оценены при помощи флюориметра Qubit («ThermoFisher», США).

Полногеномное секвенирование. Для определения полной нуклеотидной последовательности выделенных штаммов бактерий использовали секвенатор MiSeq («Illumina Inc», США). Сборку генома *de novo* осуществляли на базе программы UGENE с использованием алгоритмов SPAdes v.3.15.3. Качество сборки геномов оценивали с помощью QUAST v.5.0.2. Аннотация геномов микроорганизмов по кодирующим последовательностям ДНК (CDs) была произведена с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) при депонировании полученных геномов в базу данных. Таксономическую принадлежность изолятов определяли методом dDDH с помощью веб-сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS).

**Результаты анализа нуклеотидной последовательности образцов
чистых культур микроорганизмов**

№ образ-ца	Последовательность	Видовая принад-лежность
18	<p align="center"> AGGGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTA ATACATGCAAGTCGAGCGAGCGGAACCAACAGATTTACTTTCG GTA- ATGACGTTGGGAAAGCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACAC GTGGGGAACCTGCCCTAAGTCTGGGATACCATTTGAAACAGGT GCTAATACCGGATAATAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTTTAAAAGGC GCGTAAGCTGTCGCTAAGGGATGGCCCCGCGTGATTAGC TAGTTGGTAAGGAAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCATAGC CGAGTTGAGAGACTGATCGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCCACAAT GGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTC GGATCGTAAAGCTGTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAAGT GCCTTTATTTGACGCGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATAGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG TAAAGCGAGCGCAGGCGGAAAATAAGTCTAATGTGAAAGCCCTCGGCT TAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTG </p>	<p align="center">Сиквенс двойной с преобладанием <i>Lactobacillus amylovorus</i></p>
19	<p align="center"> GCTTGACGACTTGACGTTGGTTTACCAGCGAGTGGCGGACGGGT GAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAAAGCGGGGGATAACATTTGAAA CAGATGCTAATACCGCATAACAATTTGAATCGCATGATTCAAATTTAAA GATGGTTTCGGCTACACTTTGGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTT GTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCTGTGATGCGTAGCCGAGTT GAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACCTGAGACACGGTCCATACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGT TAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGCAACTGTTACGCGAGTGACGGTATC TAACCAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG GCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTTGGCTTAACCAAAGAAGT GCATCGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTC CATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAT GCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG </p>	<p align="center">Сиквенс двойной с преобладанием <i>Limosilactobacillus mucosae</i></p>

Сборка и аннотация генома. В результате секвенирования была определена и подтверждена принадлежность двух доминирующих изолятов к видам *Lactobacillus amylovorus* и *Limosilactobacillus mucosae* соответственно.

В результате аннотации геномов были получены данные, представленные в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что размер генома, число последовательностей, кодирующих белок, (CDSs), число рРНК и тРНК у штамма *L. amylovorus* больше, чем у *L. mucosae*, однако у второго штамма число G + C (%) и контигов достигает больших значений, чем у первого.

На рисунках 5 и 6 изображены строения геномов изученных штаммов с открытыми рамками считывания и сайтами рестрикции.

Данные, полученные в результате аннотации геномов

Характеристика/Значение	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>
Размер генома	2035254	1959850
Содержание G + C (%)	38	45
Контиги N50	2334	2080
Контиги L50	243	266
Число контигов	1296	1499
Число последовательностей, кодирующих белок (CDSs)	2809	2712
Число рРНК	52	33
Число тРНК	46	27

В результате аннотации геномов системой NCBI PGAP в геноме *Lactobacillus amylovorus* были найдены гены, кодирующие синтез бактериоцина лактококцина, или низина (номер в GenBank – MDF9460744.1; длина – 98 п.н.), а также два гена, кодирующих синтез гельветицина J (MDF9462078.1 и MDF9462173.1; длина – 312 и 342 п.н.). Также имеется ген, кодирующий синтез гельветицина, под номером MDF9462079.1 с длиной 131 п.н. Кроме того, были обнаружены 2 гена, кодирующие синтез бактериоциноподобных веществ (B1p family class II bacteriocin, MDF9460925.1 и MDF9460926.1, длиной 57 и 63 п.н. соответственно), и 2 гена безымянных бактериоцинов (MDF9461238.1 и MDF9462623.1 длиной 325 и 76 п.н.).

В итоге проекты геномов бактерий были депонированы международной электронной базой данных NCBI под индивидуальными номерами BioSample, BioProject, GenBank и Sequence Read Archive (SRA), представленными в таблице 3.

Номера в GenBank депонированных штаммов

Штамм/номер	BioSample	BioProject	GenBank	Sequence Read Archive (SRA)
<i>L. amylovorus</i>	SAMN33879542	PRJNA948185	GCA_029477185.1	SRR23952874
<i>L. mucosae</i>	SAMN33879563	PRJNA948195	GCA_029477165.1	SRR23954828

Выводы

Результаты метагеномного анализа продемонстрировали, что в слепых отростках кишечника свиней различных технологических групп (сосунов, на дорастивании и откорме) наблюдается разнообразие микробных таксономических групп, а также с возрастом их количественное соотношение не остается на постоянном уровне и изменяется. Из представителей рода *Lactobacillus* преобладающими видами оказались *Lactobacillus amylovorus* и *Limosilactobacillus mucosae*. Данные чистые культуры микроорганизмов современными масс-спектрометрическим и молекулярно-генетическими методами были идентифицированы. Были собраны и аннотированы два генома доминирующих штаммов-пробионтов, в структуре которых выявлены генетические элементы, кодирующие синтез ряда антибиотических веществ (бактериоцинов).

Таким образом, штаммы *Lactobacillus amylovorus* и *Limosilactobacillus mucosae* стали основой разрабатываемой микробной кормовой добавки и были депонированы в ИБФМ РАН под номерами ВКМ В-3750D и ВКМ В-3751D, соответственно.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научно-инновационного проекта № НИП-20.1/22.13.

Библиографический список

1. Буряко И.А. Выделение и изучение бактерий рода *Lactobacillus*, перспективных для силосования кормов: автор. дис. ... канд. биол. наук. – Минск, 1991. – 21 с.
2. Коцаев А.Г., Лысенко Ю.А., Мищенко В.А. и др. Интенсификация процесса культивирования физиологически адаптированных лактобацилл как основа создания биопрепаратов микробного происхождения для птицеводства // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – № 128. – С. 1102–1115.
3. Клименко Е.С., Погодина А.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л. Возможность таксономической идентификации бифидобактерий на основании различных варибельных районов гена 16S рРНК // Генетика. – 2020. – Т. 56, № 8. – С. 904–914.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований: учебник. – М.: Медицина. – 1978. – 394 с.
5. Локачук М.Н., Фролова Ю.М. Видовая идентификация чистых культур заквасочных микроорганизмов // Пищевые системы. – 2021. – Т. 4, № 3S. – С. 184–187.
6. Бойко А.А., Коцаев А.Г., Лысенко Ю.А. и др. Мясная продуктивность цыплят-бройлеров в зависимости от условий содержания и кормления при использовании в рационе микробной добавки // Ветеринария и кормление. – 2022. – № 3. – С. 8–11.
7. Устинова В.В., Смирнова Т.Г., Варламов Д.А. и др. Полногеномное секвенирование генома *Mycobacterium heckeshornense* // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 3. – С. 108–109.
8. Попов Д.А., Овсенко С.Т., Вострикова Т.Ю. Применение метода MALDI-TOF MS в современной микробиологической лаборатории // Поликлиника. – 2016. – № 1–3. – С. 53–56.
9. Коцаев А.Г., Фисенко Г.В., Лысенко Ю.А. и др. Продуктивность и мясные качества перепелов при использовании пробиотической кормовой добавки // Аграрная наука. – 2015. – № 11. – С. 15–18.
10. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019618111. Программа для идентификации микроорганизмов VastoSCREEN-ID:

№ 2019616938. Заяв. 14.06.2019; Опубл. 26.06.2019. Заявитель: Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственная фирма «Литех».

11. Соловьева В.В., Григорьева Т.В., Ризванов А.А. Идентификация микроорганизмов с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомной РНК: Методическое пособие. – Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2011. – 44 с.

12. Радченко В.В., Ильницкая Е.В., Шуваева Т.М. и др. Сравнительный анализ и пробиотический потенциал новых штаммов рода *Lactobacillus* из эволюционно закрепленных микробных ассоциаций желудочно-кишечного тракта дикой птицы // Биофармацевтический журнал. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 25–30.

13. Турова Т.П. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Москва, 2009. – 86 с.

14. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Мاستиленко А.В. и др. Установление видовой принадлежности штаммов энтеробактерий методом MALDI-TOF MS // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 2 (42). – С. 110–113.

15. Коцаев А.Г., Лысенко Ю.А., Радченко В.В. и др. Эффективность использования пробиотической добавки трилактокор в рационе перепелов // Аграрный вестник Урала. – 2017. – № 8 (162). – С. 4.

16. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // SPAdes: J. Comp. Biol. – 2012. – Vol. 19 (5). – Pp. 455–477.

17. Zhang J., Chen X., Liu P. et al. Dietary clostridium butyricum induces a phased shift in fecal microbiota structure and increases the acetic acid-producing bacteria in a weaned piglet model // J. Agric Food Chem. – 2018. – № 66. – Pp. 515–66.

18. Wu J., Zhao Y., Wang X. et al. Dietary nutrients shape gut microbes and intestinal mucosa via epigenetic modifications // Critic Rev Food Sci Nutri. – 2020. – 20:1–15.

19. Auch A.F. et al. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // Standards in genomic sciences. – 2010. – Vol. 2. – Pp. 117–134.

20. Vemuri R., Gundamaraju R., Shinde T. et al. *Lactobacillus acidophilus* Dds-1 modulates intestinal-specific microbiota, short-chain fatty acid and immunological profiles in aging mice // Nutrients. – 2019. – 11:6.

21. Meier-Kolthoff J.P., Goker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // Nature communications. – 2019. – Vol. 10, № 1. – 2182 p.

22. Gurevich A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29, № 8. – Pp. 1072–1075.

23. Kim E.Y., Kim Y.H., Rhee M.H. et al. Selection of *Lactobacillus* sp. Psc101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs // J. Gene Appl Microbiol. – 2007. – Vol. 53. – 111:7.

24. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast // Mol Cell. – 2000. – № 5. – Pp. 163–72.

25. Tahimic C.G., Wang Y., Bikle D.D. Anabolic effects of Igf-1 signaling on the skeleton // Front Endocrinol. – 2013. – 4:6.

26. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic acids research. – 2016 – Vol. 44, № 14. – Pp. 6614–6624.

27. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. – 2012. – V. 28, № 8. – Pp. 1166–1167.

ANALYSIS, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE MICROBIOME FROM THE CECA OF THE INTESTINES OF INDUSTRIAL PIGS

Y.A. LYSENKO^{1,2}, A.G. KOSHCHAEV², V.A. BELYAK²,
A.V. LUNEVA¹, E.YU. MARCHENKO¹

(¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;
²Kuban State Agrarian University)

The article presents data on the use of modern methods of analysis, isolation and identification of representatives of the microbiocenosis of the ceca of the intestines of industrial pigs raised using intensive technology. Bacterial metagenomic analysis was used to study the composition of microflora of various taxonomic groups in the chyme of industrial pigs. Classical microbiological research methods were used to isolate the dominant representatives of the genus Lactobacillus. Identification of the probiotically relevant microbial cultures was performed by mass spectrometric analysis using MALDI-TOF MS in a BactoSCREEN spectrometer, as well as by nucleotide sequencing of the 16S rRNA gene. Full-genome sequencing of isolated dominant pure cultures of the genus Lactobacillus was carried out. As a result of the research, it was found that in the cecum of the intestines of suckling piglets, growing and fattening pigs there is a diversity of microbial communities, which changes in quantitative proportions with age. The results of mass spectrometric analysis revealed the presence of protein spectra of important representatives of bacteria of the genus Lactobacillus, among which two species, Lactobacillus amylovorus and Limosilactobacillus mucosae, were dominant, which were additionally confirmed by analyzing their nucleotide sequence of the 16S rRNA gene and by performing full-genome sequencing.

Keywords: *intestinal microflora, pigs, isolation, identification, metagenomic analysis, gastrointestinal tract, probiotic, mass spectrometry, Lactobacillus, nucleotide sequence.*

References

1. Buryako I.A. *Isolation and study of bacteria of the genus Lactobacillus promising for silage of forages*. PhD (Biol.) thesis abstract. Minsk, USSR, 1991: 21 (In Russ.)
Isolation and selection of bacteria of the genus Lactobacillus as the basis of probiotic preparations. *Mezhdunarodnaya konferentsiya "Probiotiki, prebiotiki i sinbiotiki i funktsional'nye produkty pitaniya"*. Moscow, Russia, 2004: 19. (In Russ.)
2. Koshchaev A.G., Lysenko Yu.A., Mishchenko V.A. et al. Intensification of the process of cultivation of physiologically-adapted Lactobacillus as a basis for the creation of biopreparations of microbial origin for poultry farming. *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2017;128:1102–1115. (In Russ.)
3. Klimenko E.S., Pogodina A.V., Rychkova L.V., Bel'kova N.L. The ability of taxonomic identification of bifidobacteria based on the variable regions of 16S rRNA gene. *Genetika*. 2020;56(8):904–914. (In Russ.)
4. Labinskaya A.S. *Microbiology with microbiological research techniques*. Moscow, Russia: Meditsina. 1978:394. (In Russ.)
5. Lokachuk M.N., Frolova Yu.M. Species identification of lactobacilli for the sourdough. *Food Systems*. 2021;4(3S):184–187. (In Russ.)
6. Boyko A.A., Koshchaev A.G., Lysenko Yu.A. et al. Meat productivity of broiler chickens depending on the conditions of keeping and feeding when using microbial additives in the diet. *Veterinariya i kormlenie*. 2022;3:8–11. (In Russ.)
7. Ustinova V.V., Smirnova T.G., Varlamov D.A. et al. Full genome sequencing of the genome of Mycobacterium heckeshornense. *Bacteriology*. 2017;2(3):108–109. (In Russ.)

8. Popov D.A., Ovseenko S.T., Vostrikova T.Yu. Application of MALDI-TOF MS method in a modern microbiological laboratory. *Poliklinika*. 2016;1–3:53–56. (In Russ.)
9. Koshchaev A.G., Fisenko G.V., Lysenko Yu.A. et al. Productivity and meat quality of quails at use probiotic feed additive. *Agrarian Science*. 2015;11:15–18. (In Russ.)
10. Certificate of state registration of computer program No. 2019618111. Program for identification of microorganisms BactoSCREEN-ID: No. 2019616938: applied on 14.06.2019: published on 26.06.2019. LLC Scientific and Production Firm “Litech”. (In Russ.)
11. Solov’eva V.V., Grigor’eva T.V., Rizvanov A.A. *Identification of microorganisms using molecular genetic analysis of the nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene: methodical manual*. Kazan, Russia: Kazan Federal University, 2011:44. (In Russ.)
12. Radchenko V.V., Ilitskaya E.V., Shuvaeva T.M. et al. A comparative analysis of the probiotic potential of new strains of the genus *Lactobacillus* of the evolutionary fixed microbial associations of the gastrointestinal tract of wild birds. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal*. 2020;12(1):25–30. (In Russ.)
13. Turova T.P. Application of genosystematics methods to address taxonomy and biodiversity of prokaryotes. DSc (Bio) thesis: 03.00.07. Moscow, Russia, 2009:86. (In Russ.)
14. Vasiliev D.A., Feoktistova N.A., Mastilenko A.V. et al. Species identification of enterobacteria strains by means of MALDI-TOF MS. *Vestnik Ul’yanovskoy gosudarstvennoy sel’skhozayajstvennoy akademii*. 2018;2(42):110–113. (In Russ.)
15. Koshchaev A.G., Lysenko Yu.A., Radchenko V.V. et al. Efficiency of using probiotic additive trilactocor in the diet of quails. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2017;8(162):4. (In Russ.)
16. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *SPAdes: J. Comp. Biol.* 2012;19(5):455–477.
17. Zhang J., Chen X., Liu P. et al. Dietary clostridium butyricum induces a phased shift in fecal microbiota structure and increases the acetic acid-producing bacteria in a weaned piglet model. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66:5157–66.
18. Wu J., Zhao Y., Wang X. et al. Dietary nutrients shape gut microbes and intestinal mucosa via epigenetic modifications. *Critic Rev. Food Sci. Nutri.* 2020;20:11–5.
19. Auch A.F. et al. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*. 2010;2:117–134.
20. Vemuri R., Gundamaraju R., Shinde T. et al. *Lactobacillus acidophilus* Dds-1 modulates intestinal-specific microbiota, short-chain fatty acid and immunological profiles in aging mice. *Nutrients*. 2019;11:6.
21. Meier-Kolthoff J.P., Goker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*. 2019;10(1):2182.
22. Gurevich A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–1075.
23. Kim E.Y., Kim Y.H., Rhee M.H. et al. Selection of *Lactobacillus* sp. Psc101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs. *Gene Appl. Microbiol.* 2007;53:111–7.
24. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell*. 2000;5:163–72.
25. Tahimic C.G., Wang Y., Bikle D.D. Anabolic effects of Igf-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol.* 2013;4:6.
26. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6614–6624.
27. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–1167.

Сведения об авторах

Лысенко Юрий Андреевич, д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры ветеринарной медицины, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; старший научный сотрудник отдела сопровождения грантов и НИР ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет»; 350044, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. имени Калинина, 13; тел.: (961) 518–07–22; e-mail: yuraduban45@mail.ru

Кощаев Андрей Георгиевич, д-р биол. наук, академик РАН, профессор, профессор кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет»; 350044, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. имени Калинина, 13; тел.: (989) 288–27–48; e-mail: kagbio@mail.ru

Беляк Владимир Анатольевич, аспирант кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет»; 350044, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. имени Калинина, 13; тел.: (995) 229–43–16; e-mail: vladimirbelyj22@yandex.ru

Лунева Альбина Владимировна, д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры ветеринарной медицины, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (918) 417–21–38; e-mail: albina.luneva@mail.ru

Марченко Евгений Юрьевич, кандидат ветеринарных наук, ассистент кафедры ветеринарной медицины РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 977–17–82; e-mail: marchenko.vet@mail.ru

Information about the authors

Yuriy A. Lysenko, DSc (Bio), Associate Professor, Professor at the Department of Veterinary Medicine, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (961) 518–07–22; e-mail: yuraduban45@mail.ru)

Andrey G. Koshaev, DSc (Bio), Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Professor at the Department of Biotechnology, Biochemistry and Biophysics, Kuban State Agrarian University (13 Kalinina St., Krasnodar, 350044, phone: (989) 288–27–48; e-mail: kagbio@mail.ru)

Vladimir A. Belyak, postgraduate student, Department of Biotechnology, Biochemistry and Biophysics, Kuban State Agrarian University (13 Kalinina St., Krasnodar, 350044, phone: (995) 229–43–16; e-mail: vladimirbelyj22@yandex.ru)

Albina V. Luneva, DSc (Bio), Associate Professor, Professor at the Department of Veterinary Medicine, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (918) 417–21–38; e-mail: albina.luneva@mail.ru)

Evgeniy Yu. Marchenko, CSc (Vet), Assistant at the Department of Veterinary Medicine, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (499) 977–17–82; e-mail: marchenko.vet@mail.ru)