

Сведения о ходе выполнения проекта в 2021 году  
**«Широкомасштабный поиск и изучение микроорганизмов и микробных сообществ,  
ассоциированных с сельскохозяйственными животными и продуктами животного  
происхождения»**

Руководитель проекта д-р биол. наук Карначук О.В.

На первом этапе широкомасштабного исследования микробиомов кишечника сельскохозяйственных животных, а также кисломолочных продуктов животного происхождения были получены следующие результаты:

(1) Отобраны пробы фекалий сельскохозяйственных животных: галловейских коров (21 образец) и региональных редких сельскохозяйственных животных: алтайских маралов (олений), *Cervuselaphus sibiricus*, (52 образца), двугорбых верблюдов, *Camelus bactrianus* (50 образцов), яков, *Vos mutus*, (28 образцов) и горных баранов, *Ovis ammon*, (25 образцов).

Отобраны 44 образца проб компоста животного происхождения на территории Томского района. Из проб фекалий сельскохозяйственных животных, региональных редких сельскохозяйственных животных и компоста животного происхождения выделена ДНК в количестве достаточном для высокопроизводительного секвенирования. Несмотря на тот факт, что по плану исследования предполагался альтернативный отбор проб фекалий СЖ или компоста, в ходе выполнения проекта были отобраны как фекалии животных, так и пробы компоста. Для образца определены метаданные, в том числе координаты отбора проб, температура воздуха, минералогический состав компоста.

Из проб отобранных фекалий СЖ и РСЖ, а также компоста выделены препараты ДНК, в количестве достаточном для высокопроизводительного секвенирования. Всего выделено 268 образцов ДНК, для каждого образца выполнено описание. Препараты переданы в ФИЦ «Биотехнологии» РАН для последующего профилирования сообщества микроорганизмов по гену 16S рРНК и метагеномного анализа.

(2) Проведено высокопроизводительное секвенирование выделенных образцов ДНК с целью профилирования микробиоты исследуемых образцов по гену 16S рРНК и определен таксономический состав микробных сообществ методами биоинформатики. Также определены целевые группы микроорганизмов для выделения в культуру. Всего осуществлено профилирование микробиоты образцов фекалий 21 коров породы «Головей», 56 верблюдов, 9 яков и 16 маралов по гену 16S рРНК. Определен таксономический состав микробных сообществ. Во всех образцах фекалий доминируют представители филумов Firmicutes и Bacteroidota. Доли бактерий филумов Verrucomicrobiota, Proteobacteria, Spirochaetota и архей филума Halobacterota у разных видов животных существенно отличались. Определены целевые группы микроорганизмов для выделения в культуру – представители Firmicutes и Bacteroidota, способные деградировать целлюлозу, ксилан и крахмал.

(3) Осуществлено профилирование микробиоты 10 образцов компоста по гену 16S рРНК. Анализ таксономического состава микробиоты образцов компоста выявил преобладание бактерий филумов Proteobacteria, Bacteroidota, Chloroflexi, Actinobacteriota, Firmicutes и Мухососсота, а также архей филума Halobacterota. Определены целевые группы микроорганизмов для выделения в культуру – анаэробные целлюлозолитики филумов Bacteroidota и Chloroflexi, а также протеолитические бактерии филума Firmicutes.

(4) Осуществлено секвенирование метагеномов 10 образцов компоста. Из полученных метагеномных последовательностей определены геномы 174 микроорганизмов – членов сообществ, в том числе представителей филумов Acidobacteriota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, Deinococcota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Halobacteriota, Mucosoccota, Patescibacteria, Planctomycetota, Proteobacteria, Spirochaetota и Verrucomicrobiota. Получены номера доступа в GenBank NCBI.

(5) В результате работы отобрано и паспортизировано 85 образцов кисломолочных продуктов, изготовленных традиционным методом в различных регионах РФ: ряженка, кефир, мацони, тан, айран, сметана, творог, брынза, сыр чечил, сыр сулугуни, масло. Также было отобрано 19 образцов молока в качестве контрольных. Проведена пробоподготовка образцов для выделения ДНК и проведения NGS-профилирования микробных сообществ исследуемых продуктов. Предложен ряд новых методических решений по подготовке образцов для дальнейшей обработки как микробиологическими методами, так молекулярными (выделение ДНК). Для жидких кисломолочных продуктов (айран, ряженка, кефир и пр.) проведена ферментация в стандартных условиях и получены данные о скорости кислотообразования и динамической вязкости для конечной формы продукта. Микробиологический анализ продуктов показал наличие дрожжевой компоненты во всех продуктах кроме мацони. Количество молочнокислых микроорганизмов было не менее  $10^8$  КОЕ/мл, за исключением трех продуктов, где титр был не менее  $10^7$  КОЕ/мл, что соответствует требованию нормативных документов для промышленно произведенных кисломолочных продуктов. Максимальная вязкость (251,3 мПа\*с) была получена для айрана из села Нагутское Ставропольского края. Данный продукт демонстрировал тягучие длинные тяжи при отборе пробы.

Полученные результаты позволяют в дальнейшем провести анализ традиционных кисломолочных продуктов на территории РФ современными молекулярными методами (NGS-профилирование, метагеномный анализ продуктов), а также выделить ряд чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей. Выделенные чистые культуры могут быть в дальнейшем использованы в пищевой биотехнологии как стартовые культуры для производства кисломолочных продуктов.

(6) Проведен анализ микробных сообществ 53 образцов различных видов кисломолочных продуктов, молока и масла, с применением высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Получены данные о составе микробных сообществ молока, творога, кефира, ряженки, простокваши, мацони, айрана, сыра сулугуни, сметаны, молочной сыворотки, брынзы, тана и масла, произведенных в хозяйствах из различных регионов Российской Федерации. Преобладающей группой в большинстве молочных продуктов были представители филума Firmicutes группы молочнокислых бактерий. Большинство фирмикут относилось к родам *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* и *Lactococcus*.

(7) Впервые произведен сбор проб фекалий РСЖ Бурятии и Забайкальского края – верблюдов бактриан забайкальской породы (24 пробы), лошадей бурятской породы (14 проб), яков (2 пробы), тофаларских оленей (1 проба) и грубошерстных овец (2 пробы). Выделены ДНК из 43 образцов фекалий для исследования микробиома РСЖ. Определены метаданные образцов фекалий РСЖ – дана характеристика образцов фекалий, определен качественный и количественный состав кормов и жирнокислотный состав фекалий

верблюдов и лошадей. Изучение состава кормов верблюдов и лошадей выявил сходство/отличие в пищевых предпочтениях.

В образцах фекалий верблюдов обнаружено 28 разновидностей растений. Доминирующим видом являлась Липучка незабудковая (*Lappulamysotis*) и составляла 30 % от общего количества. В образцах фекалий лошадей обнаружено 23 разновидностей растений. Доминирующим видом являлась Шизонепетамногонадрезанная (*Schizonepetamultifida*) и составляла 51 % от общего количества.

В образцах фекалий РСЖ обнаружено 39 различных жирных кислот. Жирнокислотный состав представлен насыщенными, мононенасыщенными и одной полиненасыщенной кислотами.

Наряду с прямоцепочечными жирными кислотами, в образцах фекалий найдены характерные для растений коричневая и фенилбензойная кислоты, а также разветвленные изо-, антеизо-кислоты, альдегиды и спирты, характерные для бактерий и микроскопических грибов. Сравнительный анализ жирнокислотного состава образцов фекалий забайкальских верблюдов и бурятских лошадей методом главных компонент показал различие в составе липидных компонентов, что обусловлено, по-видимому, и с видовой принадлежностью животных, и разной пищевой базой. Зависимости состава липидных компонентов от пола животного в образцах фекалий не обнаружено.

(8) Были отобраны 14 образцов микробиоты лошадей бурятской породы, содержащихся на свободном пастбищном выгуле. Из полученного материала были сформированы фрагментные метагеномные библиотеки, которые были отсекуены на системе Novaseq™ 6000 (Illumina, США). Было получено от 19 до 75 миллионов парно-концевых прочтений с каждого образца, что соответствует объему данных от 10 до 38 миллиардов нуклеотидов. Проведена сборка и точная таксономическая идентификация метагеномных данных. Полученные результаты позволили идентифицировать 6 новых родов микроорганизмов. Дальнейший анализ полученных данных позволит выявить ключевые микроорганизмы, обеспечивающие стабильное функционирование желудочно-кишечного тракта лошадей, содержащихся в условиях пастбищного выпаса, а также определить их коровый микробиом и сопоставить полученные результаты с другими работами по метагеномному анализу микробиоты лошадей. В перспективе, полученные данные могут лечь в основу как разработки новых пробиотических препаратов для лошадей, так и создания новых ферментных препаратов, эффективно расщепляющих растительную биомассу.

(9) В рамках первого этапа исследовательской программы: разработаны технологии и методы массовых экспериментов для широкомасштабного поиска и исследования микробиоты СЖ и РСЖ, в том числе для сбора образцов фекалий, описания метаданных и анализа результатов, требования к исследовательскому набору, в том числе к составу исследовательского набора; отработаны методики исследований с использованием исследовательского набора. Проведен широкомасштабный поиск и сбор образцов для исследования микробиоты СЖ и РСЖ; выполнен анализ данных и результатов, полученных в ходе выполнения исследовательской программы с применением разработанных технологий и методов массовых экспериментов; 300 человек (обучающихся) приняли участие в реализации исследовательской программы и осуществили сбор более 100 образцов; разработана образовательная программа «Изучение микробиомов и молекулярные основы

резистентности микроорганизмов»; осуществлена подготовка обучающихся (300 обучившихся).

Геномная и метагеномная информация, полученная на первом этапе исследования, будет использована для поиска и выделения штаммов-продуцентов гидролаз на втором этапе исследования. Микроорганизмы с активной гидролитической активностью могут быть использованы в сельском хозяйстве для компостирования отходов и пищевой промышленности.