

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОАККУМУЛЯЦИИ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ШЕРСТИ И МОЛОКЕ КОРОВ НА КИШЕЧНЫЙ МИКРОБИОМ\***

**Е.А. Сизова<sup>1</sup>**, доктор биологических наук, **Е.В. Яушева<sup>1</sup>**, кандидат биологических наук, **Ю.А. Хлопко<sup>2</sup>**, **С.В. Лебедев<sup>1</sup>**, доктор биологических наук, **О.В. Маршинская<sup>1</sup>**, **Т.В. Казакова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН, 460000, Оренбург, ул. 9 Января, 29

E-mail: m.olja2013@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11

*Исследование проводили с целью оценки элементного состава шерсти и молока коров черно-пестрой породы, а также выявление взаимосвязи между содержанием токсичных и эссенциальных элементов и состоянием микробиома кишечника. Работу выполняли в условиях Оренбургской области. На основании анализа элементного состава шерсти и с применением коэффициента токсической нагрузки было сформировано две группы животных: I группа включала коров с более низким коэффициентом нагрузки; II группа особей с более высоким коэффициентом нагрузки. Аналитические исследования микроэлементного состава шерсти и молока проводили с использованием приборов для атомно-эмиссионного и масс-спектрального анализа с индуктивно связанной плазмой. Концентрация As в шерсти коров II группы увеличивалась, относительно I группы, на 19 %, Fe – на 29 %, Pb – на 24,5 %, Al – на 32,3 %, Co – на 35,6 %, Ni – на 21,5 %, V – на 18,2 %. При оценке элементного состава молока отмечено достоверное увеличение уровня Fe на 11,5 %, Cr – на 8,25 %, Mn – на 17,6 %, Pb – на 46,1 % и Cd – на 25 % во II группе, в сравнении с I группой. Явных изменений в микробиоме кишечника коров II группы не выявлено. В целом отмечена тенденция к накоплению некоторых тяжелых металлов в организме животных и молоке, что указывает на высокую вероятность нанесения вреда здоровью животных и человека.*

**ASSESSMENT OF THE EFFECT OF BIOACCUMULATION OF TRACE ELEMENTS IN THE WOOL AND MILK OF COWS ON THE INTESTINAL MICROBIOME**

**Sizova E.A.<sup>1</sup>, Yausheva E.V.<sup>1</sup>, Khlopko Y.A.<sup>2</sup>, Lebedev S.V.<sup>1</sup>, Marshinskaia O.V.<sup>1</sup>, Kazakova T.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, 460000, Orenburg, ul. 9 Yanvary, 29

E-mail: m.olja2013@yandex.ru

<sup>2</sup>Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 460000, Orenburg, ul. Pionerskaya, 11

*The aim of this study was to assess the elemental composition of hair and milk of the Black Spotted cows and to identify the relationship between the content of toxic and essential elements and the state of the intestinal microbiome. The study was carried out on the basis of the FRC BST RAS. Based on the analysis of hair elemental composition and using the coefficient of toxic load, two groups of animals were formed: Group I included cows with a lower load factor; Group II included cows with a higher load factor. Analytical studies of the trace element composition of wool and milk were carried out using atomic emission and mass spectral analysis devices with inductively coupled plasma. An increase in the concentration of heavy metals in hair and milk of animals of Group II was noted. The concentration of As, Fe, Pb, Al, Co, Ni and V in hair of cows from Group II increased relative to the first group by 19%, 29%, 24.5%, 32.3%, 35.6%, 21.5% and 18.2% respectively. Assessing the elemental composition of milk, there was a significant increase in the level of Fe by 11.5%, Cr by 8.25%, Mn by 17.6%, Pb by 46.1% and Cd by 25% in the second group in comparison with the first. There were no obvious changes in the intestinal microbiome of Group II. Thus, there was a tendency for the accumulation of some heavy metals in the body of animals and milk, which shows a high probability of causing harm to the health of animals and humans.*

**Ключевые слова:** тяжелые металлы, микробиом кишечника, молоко, минеральный обмен, крупный рогатый скот, токсичность

**Key words:** heavy metals, intestinal microbiome, milk, mineral metabolism, cattle, toxicity

Продукция животного происхождения, например, молочные продукты, играет важную роль в рационе человека и имеет особое значение в питании детей как хороший источник белка, витаминов, сахаров и минералов. Один из факторов, снижающих производство молока и его качество, а также влияющих на уровень реализации генетического потенциала животных – ухудшение условий окружающей среды. Система разведения крупного рогатого скота сегодня сталкивается с серьезными проблемами, связанными с повышенным негативным воздействием различных сфер деятельности человека на окружающую среду и организм сельскохозяйственных животных [2]. Использование тяжелых металлов в различных областях производства приводит к их аккумуляции в окружаю-

щей среде и, как следствие, к попаданию в организм животных и человека, через животноводческую продукцию [3]. Значительное содержание токсических химических элементов в животноводческой продукции крайне актуальная проблема как для развивающихся, так и для развитых стран [4]. Повышенное содержание ряда тяжелых металлов в организме человека вызывает нарушение работы печени, почек, системы кровообращения и центральной нервной системы [5]. Кроме того, воздействие тяжелых металлов на детский организм служит причиной развития нейродегенеративных заболеваний [6].

В связи с изложенным, контроль физиологического состояния, в том числе, минерального обмена эссенциальных и токсичных элементов – неотъемлемая часть

\* Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00078).

оценки здоровья животных при производстве мясной и молочной продукции.

Часто используемым материалом для оценки элементного статуса животных служит шерсть. Шерсть отражает долгосрочное состояние минерального обмена организма, что делает ее показательным и информативным биообразцом для исследований [7]. Одним из индикаторов изменений внутреннего гомеостаза жвачных животных также может быть микробиом желудочно-кишечного тракта. У крупного рогатого скота он играет фундаментальную роль в метаболических функциях хозяина и функционировании иммунной системы [8]. Изменения в составе микробиоты кишечника крупного рогатого скота тесно коррелируют с показателями продуктивности и физиологического состояния животных [9].

Цель исследования – оценка элементного состава шерсти и молока коров черно-пестрой породы, а также выявление взаимосвязей состояния микробиома кишечника с содержанием токсичных и эссенциальных элементов.

**Методика.** Исследования проводили на модели коров черно-пестрой породы ( $n=70$ ; возраст 4...6 лет; живая масса 610...640 кг; стадия лактации 30...55 суток после отела) ЗАО «Калинина» (Оренбургская область, Ташлинский район). Все животные были клинически здоровы и находились в одинаковых условиях на пастбищном содержании. Рацион кормления в расчете на голову в сутки включал 44,5 кг зеленой массы злаково-бобовой травосмеси, 11,6 кг комбикорма, 0,5 кг патоки кормовой, 0,07 кг поваренной соли. С суточным рационом животные потребляли следующие количества микро- и макроэлементов: Ca – 184,8 г, P – 110,6 г, Mg – 41 г, K – 178 г, Na – 3514 г, Al – 958,6 мг, As – 1,79 мг, B – 118,5 мг, Cd – 1,83 мг, Co – 23,9 мг, Cr – 4,31 мг, Cu – 290 мг, Fe – 2023 мг, Hg – 0,048 мг, I – 27,9 мг, Li – 2,05 мг, Mn – 1801 мг, Ni – 34,3 мг, Pb – 3,81 мг, Se – 2,01 мг, Si – 1853 мг, Sn – 0,69 мг, Sr – 249 мг, V – 2,15 мг, Zn – 1789 мг.

Содержание животных и процедуры при выполнении экспериментов соответствовали требованиям инструкций и рекомендациям «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Washington, D.C., 1996)».

Для изучения элементного статуса в качестве биосубстратов использовали образцы шерсти и молока животных. Пробы шерсти брали с верхней части холки в количестве не менее 0,4 г [10]. Образцы сырого молока отбирали индивидуально от каждой коровы, помещали в стерильные емкости и охлаждали до 5°C.

Аналитические исследования микроэлементного состава шерсти и молока по 25 элементам (Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, As, Cr, K, Na, P, Zn, I, V, Co, Se, Ti, Al, Be, Cd, Pb, Hg, Sn, Sr) проводили в лаборатории АНО «Центр биотической медицины» (Москва) с использованием приборов атомно-эмиссионного (Optima 2000DV) и масс-спектрального (Elan 9000) анализа с индуктивно связанной плазмой.

Для оценки величины токсической нагрузки на организм коров рассчитывали коэффициент суммарной токсической нагрузки –  $K_{tox}$ . Его преимущество заключается в независимости от размерности отдельных показателей и, как следствие, в возможности вычисления интегральных параметров [11].

Для подсчета коэффициента токсической нагрузки ( $K_{tox}$ ) использовали сумму коэффициентов отдельных тяжелых элементов (Mn, Fe, Cu, Zn, As, Sr, Pb, Cd, Hg):

$$K_{tox} = K_{Mn} + K_{Fe} + K_{Cu} + K_{Zn} + K_{As} + K_{Sr} + K_{Pb} + K_{Cd} + K_{Hg}$$

где  $K_{Mn} \dots K_{Hg}$  – отношение содержания определенного элемента в шерсти конкретной коровы к содержанию, соответствующему 50-ому центиллю (медиане) этого элемента в общей исследуемой выборке.

Тяжелые металлы были выбраны по атомной массе элементов – более 50 атомных единиц.

После разделения общего числа коров на группы по коэффициенту токсической нагрузки, из каждой группы выбрали по 5 животных для исследования микробиома кишечника. Изучали микробиом толстого кишечника (содержимого) коров. Отбор проб осуществляли стерильным инструментом в пробирку с раствором консерванта (DNA/RNA Shield, США) и замораживали.

Выделение ДНК из образцов проводили с использованием мини-набора QIAamp Fast DNA Stool (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Качество экстрагированной ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Концентрацию ДНК определяли количественно с помощью флуорометра Qubit 4 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) с набором dsDNA высокой чувствительности (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Перед анализом образцы гомогенизировали на TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) с лизирующей матрицей Y (MP Biomedicals, Solon, USA).

Подготовку библиотек ДНК проводили в соответствии с протоколом Illumina (Part #15044223, Rev. B.) с использованием праймеров, нацеленных на области V3–V4 гена рибосомной РНК (pPHK) SSU, S-D-Bact-0341-b-S-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') в качестве прямого праймера и S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') в качестве обратного праймера. Реакционная смесь (25 мкл) содержала оба праймера по 0,2 мкм каждого; 80 мкм dNTPs; 0,2 мкм высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Использовали следующую программу ПЦР: начальная денатурация при 95°C (3 мин.), 25 циклов – денатурация при 95°C (30 с.), отжиг при 56°C (30 с.), элонгация при 72°C (30 с.) и конечная элонгация 72°C (5 мин.). Библиотеки ДНК очищали с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) и проверяли с помощью капиллярного электрофореза на усовершенствованной системе Qiaxcel (Qiagen, Hilden, Germany) с использованием набора QIAxcel (Qiagen, Hilden, Germany). Секвенирование с парноконцевыми прочтениями 2×251 п.н. выполняли на платформе MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) с использованием набора реагентов Kit v.2 (Illumina, San Diego, CA, USA).

Подготовку, секвенирование и биоинформационную обработку библиотек ДНК осуществляли в Центре коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН (Оренбург, Россия).

Фильтрацию, дерепликацию, удаление химерных последовательностей, кластеризацию, сортировку (отсечки singletons), удаление контаминации проводили с использованием программы USEARCH v8.0. Для фильтрации применяли алгоритм fastq\_filter с минимальной длиной сиквенса 415 пн и минимальным качеством прочтения Q = 15, для репликации – алгоритм derep\_prefix, для кластеризации и удаления химерных последовательностей – алгоритм cluster\_otus (<http://drive5.com/usearch>). Для визуализации использовали ресурс MicrobiomeAnalyst.

Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики с использованием пакета

Табл. 1. Содержание химических элементов в шерсти и молоке коров в зависимости от величины  $K_{tox}$ , мг/г<sup>1</sup>

Элемент	Шерсть		Молоко	
	I группа	II группа	I группа	II группа
Al	110,0 (104,0...124,0)	145,5 (124,0...172,0)*	0,09 (0,07...0,12)	0,097 (0,07...0,11)
As	0,145 (0,125...0,155)	0,172 (0,158...0,193)*	0,001 (0,0008...0,002)	0,001 (0,0008...0,002)
B	0,808 (0,662...0,829)	0,77 (0,638...0,954)	0,19 (0,18...0,21)	0,184 (0,16...0,2)
Ca	1 318,0 (1 042,0...1 406,0)	1 188,0 (1 083,0...1 264,0)	1053 (1000...1120)	982,5 (896...1114)
Cd	0,008 (0,007...0,009)	0,009 (0,008...0,011)	–	–
Co	0,101 (0,089...0,117)	0,137 (0,121...0,15)*	0,002 (0,0018...0,0022)	0,0021 (0,0018...0,0024)
Cr	0,664 (0,562...0,799)	0,782 (0,701...0,828)	–	–
Cu	7,73 (7,680...8,10)	7,71 (7,520...9,34)	0,028 (0,025...0,0315)	0,0285 (0,0265...0,0335)
Fe	220,0 (160,000...247,0)	284,0 (240,0...326,0)*	–	–
Hg	0,005 (0,005...0,007)	0,007 (0,005...0,008)	0,00018 (0,00016...0,00048)	0,00018 (0,00016...0,00047)
I	0,399 (0,332...0,521)	0,409 (0,359...0,454)	0,0057 (0,0044...0,009)	0,0052 (0,0043...0,0087)
K	813,0 (778,0...1 055,0)	769,5 (655,0...939,0)	1576 (1522...1686)	1640 (1533...1701)
Li	0,297 (0,233...0,299)	0,284 (0,257...0,307)	0,03 (0,02...0,04)	0,034 (0,02...0,044)
Mg	212,0 (166,0...258,0)	224,5 (192,0...237,0)	113,5 (99,3...120,5)	111 (96,7...118,2)
Mn	8,36 (7,580...9,31)	9,345 (8,07...10,88)	–	–
Na	349,000 (256,0...562,0)	262,0 (223,0...364,0)	460,5 (419,7...510,5)	478 (431...524,3)
Ni	0,386 (0,340...0,421)	0,469 (0,426...0,499)*	0,04 (0,03...0,05)	0,04 (0,03...0,06)
P	243,0 (195,0...251,0)	205,0 (177,0...233,0)	1080 (1006...1110)	1124 (1020...1173)
Pb	0,159 (0,157...0,183)	0,198 (0,185...0,215)*	–	–
Sr	4,51 (3,660...5,17)	4,185 (3,79...4,6)	0,86 (0,70...1,01)	0,88 (0,71...1,01)
Se	0,19 (0,16...0,197)	0,183 (0,149...0,221)	0,027 (0,025...0,031)	0,026 (0,025...0,03)
Si	16,67 (15,74...23,89)	18,9 (14,76...20,04)	1,93 (1,82...2,26)	1,89 (1,81...2,2)
Sn	0,014 (0,014...0,028)	0,014 (0,012...0,021)	0,00068 (0,00011...0,0037)	0,00068 (0,00011...0,0036)
V	0,445 (0,404...0,471)	0,526 (0,483...0,57)*	0,0096 (0,0082...0,01)	0,0096 (0,0081...0,01)
Zn	114,0 (110,0...117,0)	124,0 (114,0...130,0)	–	–

<sup>1</sup>данные представлены в виде медианы (Me) и 25...75-го квартилей (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>);  
\*p≤0,05 – I группа, по сравнению со II группой.

«StatSoft STATISTICA 10»). Для данных по таксономическому составу микробиома кишечника различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$  с использованием критерия Стьюдента. Проверку соответствия данных по элементному составу шерсти и молока нормальному закону распределения проводили при помощи критерия согласия Колмогорова. Гипотеза о их принадлежности нормальному распределению отклонена во всех случаях с вероятностью 95 %, что обосновало применение непараметрических процедур обработки статистических совокупностей (U-критерий Манна-Уитни). Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и 25...75-го квартилей (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>).

**Результаты и обсуждение.** После расчета  $K_{tox}$  было сформировано две группы: I включала коров с более низким коэффициентом нагрузки ( $K_{tox} < 8,95$ ), относительно исследуемой выборки; II группа включала коров с более высоким коэффициентом нагрузки ( $K_{tox} > 8,95$ ).

Оценка содержания химических элементов в шерсти коров выявила закономерность нарастания среднестатистических значений концентраций отдельных элементов при увеличении  $K_{tox}$  (табл. 1). Содержание As, Fe, Pb, Al, Co, Ni и V в шерсти коров II группы статистически достоверно увеличивалась, относительно I группы, на 19 %, 29 %, 24,5 %, 32,3 %, 35,6 %, 21,5 % и 18,2 % соответственно. Кроме того, во II опытной группе, в сравнении с I группой, было отмечено повышение уровня ряда других элементов (Hg, Mn, Zn, Si, Mg). По Ca, K, Na, P, Se, B, Sr наблюдали обратную тенденцию.

Анализ элементного состава молока коров не показал достоверных различий между опытными группами для большей части исследуемых элементов. Отмечено только достоверное ( $p \leq 0,05$ ) увеличение уровня Fe во второй

группе, в сравнении с первой, на 11,5 %, Cr – на 8,25 %, Mn – на 17,6 %, Pb – на 46,1 % и Cd – на 25 %, одновременно содержание Zn снизилось на 21,8 % (рис. 1).

Использование корреляционного анализа (по Спирмену) позволило оценить связь между изменениями содержания ряда химических элементов в шерсти и в молоке. Сильная отрицательная корреляция отмечена для концентрации Al в шерсти и Cr в молоке ( $r = -0,86$ ), Mn в шерсти и Fe в молоке ( $r = -0,94$ ). Умеренную отрицательную корреляцию (элемент в шерсти – элемент в молоке) наблюдали для As-Fe ( $r = -0,54$ ), Pb-Zn ( $r = -0,67$ ), Fe-Cr ( $r = -0,68$ ), и умеренную положительную для Pb-Cd ( $r = 0,61$ ), Al-Pb ( $r = 0,67$ ), Fe-Fe ( $r = 0,57$ ), Cd-Cd ( $r = 0,58$ ), Mn-Mn ( $r = 0,56$ ).

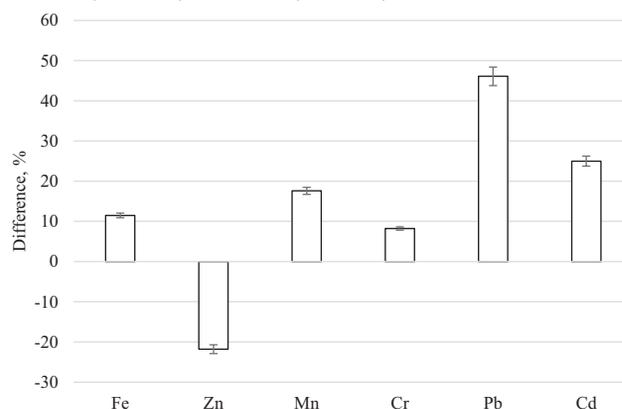


Рис. 1. Значимые изменения ( $p \leq 0,05$ ) в содержании ряда химических элементов в молоке коров II группы, относительно показателей коров I группы.

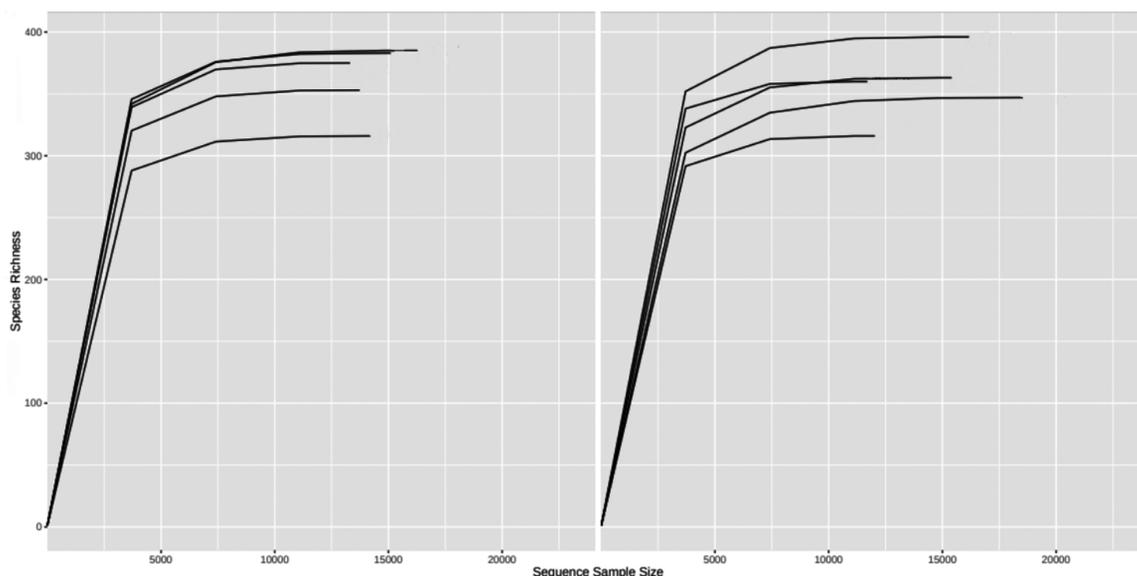


Рис. 2. Кривые разрежения на основе последовательностей для образцов микробиоты кишечника I (справа) и II (слева) групп.

Анализ микробиоты кишечника коров показал высокое разнообразие таксономических групп. В результате секвенирования, получено 301938 ридов (прочтений), на образец приходилось от 26613 до 33808 исходных ридов. После этапов слияния и фильтрации в анализ включены 253319 ридов. После кластеризации было получено 516 OTU, после удаления синклтонов и даблтонов осталось 496 OTU. Следует отметить, что 21 OTU встречались только в одной из 10 проб, поэтому из дальнейшего анализа они были удалены.

На основе полученных последовательностей и OUP были построены кривые разрежения. У всех образцов они имеют тенденцию выходить на плато к максимуму, что указывает на достаточность глубины секвенирования для характеристики микробиоты рубца в исследовании (рис. 2).

Полученные OTUs таксономически были сгруппированы от уровня филума до уровня рода и в I группе отнесены к 12 филумам, 22 классам, 27 порядкам, 43 семействам, 92 родам, во II группе – к 11 филумам, 21 классу, 26 порядкам, 42 семействам, 91 роду.

В образцах от коров I группы наиболее многочисленными были филумы *Firmicutes* (32,1 %) и *Bacteroidetes* (60,1 %). Среди малочисленных отмечены *Proteobacteria* (3,98 %) и *Spirochaetes* (1,37 %) (табл. 2).

На более глубоких таксономических уровнях самыми многочисленными таксонами были классы *Bacteroidia* (32,1 %) и *Clostridia* (58,8 %), семейства *Ruminococcaceae* (46,1 %), *unclassified\_Bacteroidales* (13 %), *Lachnospiraceae* (8,72 %) и *Bacteroidaceae* (8,35 %). Основное количество классифицированных микроорганизмов на уровне рода относилось к *unclassified\_Ruminococcaceae* (41,6 %), и *unclassified\_Bacteroidales* (13 %).

В образцах от коров II группы наблюдали аналогичное соотношение основных таксономических групп микроорганизмов микробиоты кишечника. Отмечено достоверное снижение количества микроорганизмов относящихся к классу *Gammaproteobacteria* (род *Ruminobacter*) на 2 % (P-value = 8,82).

Расчеты индексов альфа разнообразия позволили оценить богатство, разнообразие и однородность микробиоты кишечника коров (табл. 3). С одной стороны

Табл. 2. Таксономическое разнообразие микробиоты кишечника коров черно-пестрой породы

Таксон	Группа		P-value
	I	II	
<b>филум</b>			
Bacteroidetes	32,1±1,21	32,2±1	0,06
Firmicutes	60,1±1,01	61,9±0,89	1,34
Proteobacteria	3,98±0,41	2,2±1,02	1,62
Spirochaetes	1,37±0,43	1,96±0,34	1,08
Другие	2,45±0,24	1,74±0,43	1,44
<b>класс</b>			
Bacteroidia	32,1±1,21	32,2±1,00	0,06
Clostridia	58,8±1,13	60,1±1,41	0,72
Gammaproteobacteria	3±0,23	0,88±0,07*	8,82
Spirochaetia	1,37±0,43	1,96±0,34	1,08
Другие	4,73±0,45	4,86±0,39	0,22
<b>семейство</b>			
Bacteroidaceae	8,35±0,42	7,81±0,33	1,01
Muribaculaceae	1,54±0,83	2±0,09	0,55
Paludibacteraceae	4,26±0,55	4,07±0,42	0,28
Prevotellaceae	1,71±0,53	2,24±0,44	0,77
Rikenellaceae	3,53±0,16	3,11±0,33	1,15
unclassified_Bacteroidales	13±1,27	13,1±1,29	0,06
Lachnospiraceae	8,72±0,77	8,81±1,68	0,05
Ruminococcaceae	46,1±0,93	47,5±1,95	0,65
Succinivibrionaceae	3±0,23	1±0,19*	6,7
Spirochaetaceae	1,23±0,42	1,95±0,36	1,3
Другие	8,56±0,86	8,41±0,62	0,14
<b>род</b>			
Phocaeicola	6,9±0,39	6,12±0,28	1,63
Paludibacter	4,26±0,55	4,07±0,42	0,28
Alistipes	3,34±0,15	3,01±0,32	0,93
unclassified_Bacteroidales	13±1,27	13,1±1,29	0,06
unclassified_Lachnospiraceae	5,99±0,62	6,1±1,24	0,08
unclassified_Ruminococcaceae	41,6±0,95	42,9±1,92	0,61
Ruminobacter	2,74±0,27	0,7±0,06*	7,3
Другие	22,2±1,03	24±0,83	1,36

\*различия между группами достоверны при p ≤ 0,05 (по критерию Стьюдента)

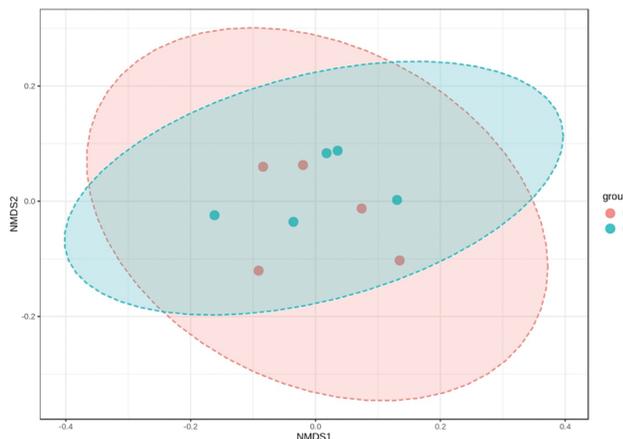
**Табл. 3. Индексы альфа разнообразия микробиоты кишечника коров I и II групп**

Показатель	Группа		P-value
	I	II	
chao1	356,4	362,6	0,75
ACE	358,8	362,4	0,75
Fisher's alpha	67,425	67,44	0,73
simpson	0,04	0,04	0,67
shannon	6,65	6,63	0,98

величины индексов Chao1, ACE и Simpson свидетельствовали о таксономическом богатстве микробиоты кишечника экспериментальных групп и об отсутствии преобладания в выборках одного большого OTU. С другой стороны они продемонстрировали отсутствие значимых различий между экспериментальными группами.

Аналогично об отсутствии достоверных различий между экспериментальными группами свидетельствуют величины показателей разнообразия индекс Shannon\_2 и Fisher's alpha.

Результаты анализа PERMANOVA для оценки бета разнообразия указывают на отсутствие значимого влияния уровня нагрузки тяжелыми металлами на расстояние Брея-Кертиса (рис. 3). Значимых различий в организации бактериальных сообществ кишечника между образцами от I и II групп не наблюдали (p-value > 0,05).



**Рис. 3. Бета разнообразие микробиоты кишечника коров I и II групп с использованием статистического метода PERMANOVA, не метрического многомерного масштабирования и несходства Брея-Кертиса.**

Сравнение содержания химических элементов в шерсти коров I и II групп со значениями ( $Q_{25}$ - $Q_{75}$  – центильные интервалы), которые рекомендованы как оптимальные для коров молочных пород, показал схожие отклонения для животных обеих групп [12]. В обеих опытных группах отмечено более высокое содержание Na, K, Mg, I и Se и пониженный уровень Co, As и Cr в шерсти животных. Однако для коров из группы с высоким  $K_{tox}$  отмечено более выраженное отклонение содержания химических элементов в шерсти от рекомендуемого физиологического диапазона, в сравнении с животными из группы с низким  $K_{tox}$ . Тем не менее, подобные расхождения, вероятно, в большей степени обусловлены уровнем метаболических процессов, возрастом и генотипом животных [1].

Сравнение экспериментальных данных по обеим группам между собой показало, что увеличение содержания в шерсти животных тяжелых металлов сопровождается изменением метаболизма других химических элементов в их шерсти. Действительно, элементный профиль шерсти молочных коров II группы характеризовался нарастанием концентрации практически всех элементов относительно I группы. Ранее аналогичные результаты были получены на коровах голштинской породы. На фоне увеличения уровня свинца в шерсти отмечали более высокие концентрации Co, Cr, Fe, Mn и I [13]. Тенденция к увеличению уровня Cd, Hg и Zn в шерсти животных сопровождалась повышением концентрации Co и I и снижением содержания Ca, K, P и Se [14]. Сходные результаты получены на модели скаковых лошадей. По мере увеличения содержания токсичных металлов в волосах их грив отмечали достоверное увеличение количества таких элементов, как Co, Fe, Mn, V, As и снижение концентрации B и Si [15].

Подобные изменения уровня химических элементов в организме животных представляют особый интерес, учитывая данные об их корреляции с изменением продуктивных показателей животных и качества молока. Согласно результатам проведенных исследований, увеличение содержания ряда тяжелых металлов в шерсти коррелирует со снижением молочной продуктивности коров [14]. Некоторые авторы отмечают, что повышенное поступление в организм крупного рогатого скота тяжелых металлов коррелирует не только с изменением элементного состава молока, но и со снижением таких показателей качества молочной продукции, как содержание протеина, жира и лактозы в молоке [16].

Однако отклонения в метаболизме ряда элементов в организме коров II группы были не достаточными для ярко выраженного изменения состава микробиома их кишечника. Было отмечено отсутствие отличий в таксономическом богатстве микробиомов кишечника коров I и II групп. Возможно, это обусловлено высокой устойчивостью отдельных штаммов бактерий и их способностью к детоксикации тяжелых металлов [17].

Среди значимых изменений микробиома кишечника коров II группы отмечена тенденция к увеличению численности бактерий класса *Gammaproteobacteria* (род *Ruminobacter*) – деструкторов полисахаридов. Вероятно, предпосылки для этого связаны со способностью некоторых тяжелых металлов снижать активность таких желудочных ферментов, как альфа-амилаза [18].

Возможным следствием изменений в элементном составе шерсти, которое показывало присутствие отклонений в метаболизме ряда химических элементов в организме коров, стало изменение уровня некоторых элементов в молоке. Увеличение Mn, Pb и Cd в молоке животных из II группы было достоверно выше, чем в шерсти, на 5,8, 21,6 и 12,5 % соответственно, что, вероятно, обусловлено накопительным эффектом. Исключением стал Fe, накопление которого в молоке было ниже, чем в шерсти, на 17,5 %. Мы отметили корреляционную связь (умеренную и сильно выраженную) между изменениями концентраций токсичных металлов в шерсти и молоке. Схожие закономерности наблюдали и другие исследователи. В частности, продемонстрировано, что рост содержания кадмия и свинца в крови и моче животных достоверно коррелирует с увеличением их количества в молоке [19].

Наблюдаемое повышение концентрации ряда токсичных элементов в шерсти и молоке животных второй группы требует разъяснений о вероятных источниках тяжелых металлов и причин их накопления в организме.

В рамках исследования искусственное внесение добавок с высокой концентрацией ряда тяжелых металлов в рацион отсутствовало. В связи с этим наиболее вероятные источники их поступления – вода и корм, потребляемый в условиях свободного выгула (пастбищное содержание). В исследованиях отмечена значимая корреляция между уровнем отдельных элементов (As, Pb, Cd) в корме, воде и молоке животных [16]. Повышение содержания токсичных металлов в организме животных, на фоне низкой их концентрации в рационе и воде, вероятно, обусловлено накопительным эффектом, который наблюдается для некоторых из них. В литературе отмечается, что низкое потребление кадмия и свинца с кормом не сопровождается резким увеличением их содержания в молочных продуктах, но приводит к накоплению и сохранению в течение длительного периода в почках, печени и костях. В то же время известно о увеличении концентрации некоторых тяжелых металлов в молоке при повышении их содержания в организме [20].

Вероятной причиной накопления отдельных металлов в организме некоторых коров при одинаковых условиях содержания могут быть различия в уровне обменных процессов в организме. Например, известно, что такие элементы как Cu, Mn, Zn в более высокой концентрации накапливаются у повторнородящих коров, в сравнении с первородящими [21]. Отмечается взаимосвязь уровня некоторых тяжелых металлов в шерсти коров с уровнем их продуктивности. Например, низкие показатели продуктивности коррелируют с повышенными концентрациями свинца в шерсти [22]. Принимая это во внимание, вероятно, варьирование пула элементов в организме животных косвенно зависит от факторов, влияющих на продуктивность. Среди них можно отметить окислительный стресс, развитие которого тесно связано с показателями удоя. У высокопродуктивных коров оно наблюдается на пике лактации, что выражается в повышении уровня малонового диальдегида в молоке и снижении его пищевой ценности. После пика лактации метаболический статус стабилизируется, и уровень малонового диальдегида уменьшается. Коровы, производящие большое количество молока, с большей вероятностью будут подвергаться воздействию окислительного стресса, что будет оказывать влияние не только на показатели удоя и качество молока, но и на все обменные процессы в организме [23].

Метаболическая активность микробиома рубца и кишечника коров также служит одним из факторов различий в обменных процессах в организме животных. Микробиом желудочно-кишечного тракта способен изменять метаболический исход токсичных веществ, поступающих из окружающей среды, меняя их уровень всасывания [24].

Кроме того, изменения метаболического пула токсичных элементов могут быть обусловлены эффективностью работы собственной системы детоксикации тяжелых металлов, представленной белками металлопротеинами [25].

Таким образом, в результате исследований отмечено нарастание содержания тяжелых металлов в шерсти и молоке животных II группы. При этом достоверных изменений в концентрациях большей части эссенциальных элементов (Ca, P, Na, Co, K, Se и др.) в молоке животных не наблюдали, в то время как их содержание в шерсти животных было снижено. Также не отмечены признаки реорганизации кишечного микробиома у животных с повышенным коэффициентом токсической нагрузки. Возможно, изменения метаболизма элементов в организме животных II группы были не критичными, или для

появления явных сдвигов в минеральном составе молока требуется более длительный период воздействия. В то же время, тенденция к накоплению некоторых тяжелых металлов, как в шерсти, так и в молоке указывает на высокую вероятность их негативного влияния на здоровье животных и человека. В связи с этим необходимо дальнейшее проведение мониторинга состояния животных и динамическое наблюдение за более широким спектром показателей здоровья животных, включая анализ активности металлоспецифичных белков в крови животных, метаболических путей микробиома кишечника и связи уровня окислительного стресса с изменениями метаболического пула макро- и макроэлементов.

### Литература

1. *Phenotypic and genetic analysis of milk and serum element concentrations in dairy cows* / S.J. Denholm, A.A. Sneddon, T.N. McNeilly, et al. // *J Dairy Sci.* 2019. No. 102(12). P. 11180-11192. doi: 10.3168/jds.2019-16960
2. *A critical review of advancement in scientific research on food animal welfare-related air pollution* / J.Q. Ni, M.A. Erasmus, C.C. Croney, et al. // *Journal of Hazardous Materials.* 2021. No. 408. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389420324584?via%3Dihub> (дата обращения: 20.03.2022). doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124468
3. *Heavy metals in food crops: health risks, fate, mechanisms, and management* / P.K. Rai, S.S. Lee, M. Zhang, et al. // *Environment International.* 2019. No. 125. P. 365-385. doi: 10.1016/j.envint.2019.01.067
4. *Metal (Pb, Cu, Cd, and Zn) Transfer along Food Chain and Health Risk Assessment through Raw Milk Consumption from Free-Range Cows* / M. Miclean, O. Cadar, E.A. Levei, et al. // *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2019. No. 16(21). URL: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/21/4064> (дата обращения: 22.03.2022). doi: 10.3390/ijerph16214064
5. *The Effects of Cadmium Toxicity* / G. Genchi, M.S. Sinicropi, G. Lauria, et al. // *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2020. No. 17(11). URL: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/11/3782> (дата обращения: 20.03.2022). doi: 10.3390/ijerph17113782
6. *Heavy Metals in Acrylic Color Paints Intended for the School Children Use: A Potential Threat to the Children of Early Age* / M.R. Khan, N. Ahmad, M. Ouladsmame, et al. // *Molecules.* 2021. No. 26(8). URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2375> (дата обращения: 22.03.2022). doi: 10.3390/molecules26082375
7. *Evaluation of sulfur status in dairy cows in Germany* / L. Pieper, K. Wall, A. E. Müller, et al. // *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere.* 2016. No. 44(02). P. 92-98. doi: 10.15653/TPG-150901
8. *The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle* / M.J. Alipour J. Jalanka, T. Pessa-Morikawa, et al. // *Scientific Reports.* 2018. No. 8(1). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28733-y> (дата обращения: 25.03.2022). doi: 10.1038/s41598-018-28733-y
9. *Myer P.R. Bovine Genome-Microbiome Interactions: Metagenomic Frontier for the Selection of Efficient Productivity in Cattle Systems* // *mSystems.* 2019. No. 4(3). URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00103-19> (дата обращения: 20.03.2022). doi: 10.1128/mSystems.00103-19

10. Method of sampling beef cattle hair for assessment of elemental profile / S. Miroshnikov, A. Kharlamov, Zavyalov O., et al. // *Pakistan Journal of Nutrition*. 2015. No. 9(14). P. 632-636. doi: 10.3923/pjn.2015.632.636
11. Чадова Л.А. Особенности техногенных элементозов у работников тепловых электростанций // *Вестник ОГУ*. 2006. №2. С. 90-92.
12. The Reference Values of Hair Content of Trace Elements in Dairy Cows of Holstein Breed / S.A. Miroshnikov, A.V. Skalny, O.A. Zavyalov et al. // *Biological Trace Element Research*. 2020. No. 194(1). P. 145-151. doi: 10.1007/s12011-019-01768-6
13. The content of toxic elements in hair of dairy cows as an indicator of productivity and elemental status of animals / S. Miroshnikov, O. Zavyalov, A. Frolov, et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. No. 26(18). P. 18554-18564. doi: 10.1007/s11356-019-05163-5
14. The total accumulation of heavy metals in body in connection with the dairy productivity of cows / S. Miroshnikov, S. Notova, T. Kazakova, et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. 2021. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-021-14198-6> (дата обращения: 21.03.2022). doi: 10.1007/s11356-021-14198-6
15. The total content of toxic elements in horsehair given the level of essential elements / V. Kalashnikov, A. Zaitsev, M. Atroschenko, et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. No. 26(24). P. 24620-24629. doi: 10.1007/s11356-019-05630-z
16. Relationships between Pb, As, Cr, and Cd in individual cows' milk and milk composition and heavy metal contents in water, silage, and soil / X. Zhou, N. Zheng, C. Su, et al. // *Environmental Pollution*. 2019. No. 255(Pt 2). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749119333391?via%3Dihub> (дата обращения: 25.03.2022). doi: 10.1016/j.envpol.2019.113322
17. Bacteria-zinc co-localization implicates enhanced synthesis of cysteine-rich peptides in zinc detoxification when *Brassica juncea* is inoculated with *Rhizobium leguminosarum* / G.A. Adediran, B.T. Ngwenya, J.F.W. Mosselmann, et al. // *New Phytologist*. 2016. No. 209(1). P. 280-293. doi: 10.1111/nph.13588
18. The effects of high dose of two manganese supplements (organic and inorganic) on the rumen microbial ecosystem / S. Kišidayová, P. Pristaš, M. Zimováková, et al. // *PLoS One*. 2018. No. 13(1). URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191158> (дата обращения: 20.03.2022). doi: 10.1371/journal.pone.0191158
19. Heavy metals in blood, milk and cow's urine reared in irrigated areas with wastewater / C. Numa, C.S. Francisco, Fuentes de Maria-Torres, et al. // *Heliyon*. 2021. No. 7(4). URL: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(21\)00796-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844021007969%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(21)00796-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844021007969%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.03.2022). doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06693
20. Accumulation and depletion of cadmium and lead in tissues and milk of lactating cows fed small amounts of these metals / R.P. Sharma, J.C. Street, J.L. Shupe, et al. // *Journal of Dairy Science*. 1982. No. 65(6). P. 972-979. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82298-4
21. Immune responses in lactating Holstein cows supplemented with Cu, Mn, and Zn as sulfates or methionine hydroxy analogue chelates / L.M. Nemeč, J.D. Richards, C.A. Atwell et al. // *Journal of Dairy Science*. 2012. No. 95(8). P. 4568-4577. doi: 10.3168/jds.2012-5404
22. Мирошников С.А., Завьялов О.А., Фролов А.Н. Влияние концентрации свинца в шерсти на межэлементное взаимодействие и молочную продуктивность голштигских коров // *Животноводство и кормопроизводство*. 2019. №. 1(102). С. 54-70.
23. Kapusta A., Kuczyńska B., Puppel K. Relationship between the degree of antioxidant protection and the level of malondialdehyde in high-performance Polish Holstein-Friesian cows in peak of lactation // *PLoS One*. 2018. No. 13(3). URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0193512> (дата обращения: 20.03.2022). doi: 10.1371/journal.pone.0193512.
24. Collins S.L., Patterson A.D. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020. No. 10(1). C. 19-32. doi: 10.1016/j.apsb.2019.12.001
25. Metallothionein in Brain Disorders / D. Juárez-Rebollar, C. Rios, C. Nava-Ruiz, et al. // *Oxid Med Cell Longev*. 2017. No. 2017. URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/5828056/> (дата обращения: 25.03.2022). doi: 10.1155/2017/5828056

Поступила в редакцию 25.04.2022

После доработки 30.05.2022

Принята к публикации 27.06.2022