

## БИОХИМИЯ, ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

### BIOCHEMISTRY, GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-4-858

УДК 579



Научная статья

### АНАЛИЗ ПРИСУТСТВИЯ ТОКСИНОВ *ESCHERICHIA COLI*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, *C. DIFFICILE* В ОБЪЕМИСТЫХ КОРМАХ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

*В.А. Филиппова, Е.А. Йылдырым, Л.А. Ильина, Г.Ю. Лаптев,  
А.В. Дубровин, В.А. Заикин, К.А. Калиткина, А.С. Дубровина,  
И.Г. Малахов, И.А. Ключникова*

**Обоснование.** Во время заготовки объемистых кормов нежелательная микрофлора может попасть на кормовые культуры во время уборки с почвой, которая может содержать различные патогенные микроорганизмы, в том числе клостридии и энтеробактерии, попадающие в нее при внесении на поля навоза в качестве удобрения. В результате силос может становиться непригодным для использования в качестве корма для животных.

**Цель.** Оценить наличие в консервированных кормах в хозяйствах Ленинградской области генов токсинов бактерий: шигатоксина (*stx1*, *stx 2*), интимина (*eae*), энтерогемоллизина (*ehxA*) энтеробактерий; альфа токсина (*cpa*), бета токсина (*cpb*) и эпсилон токсина (*etx*) *C. perfringens*; бинарного токсина (*cdtB*), токсина А (*tcdA*) и В (*tcdB*) *C. difficile*.

**Материалы и методы.** В исследовании использованы методы молекулярной биологии: высокопроизводительное секвенирование фрагмента гена 16S рРНК для оценки микробного сообщества силоса и ПЦР для оценки при-

сутствия генов токсинов в силосном сообществе. На основании полученных данных проведен биоинформатический анализ.

**Результаты.** В результате анализа проб силосов из большинства районов Ленинградской области на присутствие генов шигатоксина (*stx1*, *stx 2*), интимина (*eae*), энтерогемоллизина (*ehxA*) энтеробактерий; альфа токсина (*cpa*), бета токсина (*cpb*) и эпсилон токсина (*etx*) *C. perfringens*; бинарного токсина (*cdtB*), токсина А (*tcdA*) и В (*tcdB*) *C. difficile* при помощи метода ПЦР было показано, что образцы силоса загрязнены некоторыми генетическими детерминантами токсичности бактерий. Гены интимина, бета токсина и бинарного токсина не были выявлены ни в одном из исследованных образцов. Сильно загрязненными токсинами были около 32% исследованных кормов. Без присутствия токсинов было выявлено 23% силосов.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что быстрое закисление лактобактериями силосуемой массы способствует снижению развития патогенных энтеробактерий и клостридий.

**Ключевые слова:** силос; бактериальные токсины; ПЦР; *E. coli*; *Clostridium sp.*

**Для цитирования.** Филиппова В.А., Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю., Дубровин А.В., Заикин В.А., Калиткина К.А., Дубровина А.С., Малахов И.Г., Ключникова И.А. Анализ присутствия токсинов *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile* в объемистых кормах Санкт-Петербурга и Ленинградской области // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2024. Т. 16, №4. С. 164-185. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-4-858

Original article

## ANALYSIS OF THE PRESENCE OF TOXINS FROM *ESCHERICHIA COLI*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, *C. DIFFICILE* IN BULK FEEDS OF SAINT-PETERSBURG AND LENINGRAD REGION

V.A. Filippova, E.A. Yildirim, L.A. Ilina, G.Yu. Laptev,  
A.V. Dubrovin, V.A. Zaikin, K.A. Kalitkina, A.S. Dubrovina,  
I.G. Malakhov, I.A. Klyuchnikova

**Background.** Undesirable microflora can enter forage crops during harvesting with soil, which can contain various pathogenic microorganisms, including clostrid-

ia and enterobacteria, which enter it when manure is applied to fields as fertilizer. As a result, the silage may become unsuitable for use as animal feed.

**Purpose.** Assess the presence of bacterial toxin genes in canned food on farms in the Leningrad region: shiga toxin (*stx1*, *stx 2*), intimin (*eae*), enterohemolysin (*ehxA*) of enterobacteria; alpha toxin (*cpa*), beta toxin (*cpb*) and epsilon toxin (*etx*) *C. perfringens*; binary toxin (*cdtB*), toxin A (*tcdA*) and B (*tcdB*) *C. difficile*.

**Materials and methods.** The study used molecular biology methods: high-throughput sequencing of a fragment of the *16S*rRNA gene to assess the microbial community of silage and PCR to assess the presence of toxin genes in the silage community. Based on the data obtained, a bioinformatics analysis was carried out.

**Results.** As a result of the analysis of silage samples from most districts of the Leningrad region for the presence of genes for shiga toxin (*stx1*, *stx 2*), intimin (*eae*), enterohemolysin (*ehxA*) of enterobacteria; alpha toxin (*cpa*), beta toxin (*cpb*) and epsilon toxin (*etx*) *C. perfringens*; binary toxin (*cdtB*), toxin A (*tcdA*) and B (*tcdB*) *C. difficile*, silage samples were shown to be contaminated by several genetic determinants of bacterial toxicity using PCR. The genes for intimin, beta toxin and binary toxin were not identified in any of the samples examined. About 32% of the tested feeds were heavily contaminated with toxins. 23% of silos were found to be free of toxins.

**Conclusion.** The data obtained indicate that rapid acidification of the silage mass by lactobacilli helps to reduce the development of pathogenic enterobacteria and clostridia.

**Keywords:** silage; bacterial toxins; PCR; *E. coli*; *Clostridium sp.*

**For citation.** Filippova V.A., Yildirim E.A., Ilina L.A., Laptev G.Yu., Dubrovin A.V., Zaikin V.A., Kalitkina K.A., Dubrovina A.S., Malakhov I.G., Klyuchnikova I.A. Analysis of the Presence of Toxins From *Escherichia coli*, *Clostridium Perfringens*, *C. difficile* in Bulk Feeds of Saint-Petersburg and Leningrad Region. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2024, vol. 16, no. 4, pp. 164-185. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-4-858

## Введение

Силосование растительного сырья является основным биологическим методом его сохранения, который тысячелетиями использовался для длительного хранения кормов. В норме консервация достигается за счет быстрого снижения pH среды, которое обеспечивается при помощи молочнокислых бактерий. Эпифитные молочнокислые бактерии утилизируют простые углеводы, содержащиеся в силосованных растениях и метаболизируют их до молочной кислоты и в меньшей степени до уксус-

ной кислоты, что предотвращает порчу силоса и позволяет ему храниться длительное время. Производство силосованных кормов имеет важное значение в странах с суровыми зимними сезонами, где животные не могут круглый год получать необходимое им количество энергии или питательных веществ с выпаса, а также в регионах с влажным климатом, где трудно заготавливать и хранить сено [16]. При нормальном развитии процессов силосования получается качественный и безопасный корм для животных. Однако при нарушении процессов, когда закисление среды происходит недостаточно быстро, начинают размножаться патогенные и условно-патогенные микроорганизмы.

Некачественный силос может содержать патогенные микроорганизмы [20], которые снижают продуктивность животных [9], вызывают болезни крупного рогатого скота [17] и представляют угрозу для здоровья человека [15; 20]. Большое количество исследований в настоящее время посвящено загрязнению кормов микотоксинами, в то время как исследования контаминации кормов животных бактериальными токсинами находится в тени, хотя данные исследования, несомненно, могут оказать значительное положительное влияние, как на здоровье сельскохозяйственных животных, так и непосредственно на здоровье человека [11].

Корма обычно заражаются патогенами при внесении на поля навоза в качестве удобрения или вследствие переноса через почву во время сбора урожая [19]. Крупный рогатый скот является основным резервуаром некоторых патогенных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* O157:H7 [7], которые могут попадать в навозные отстойники с навозом крупного рогатого скота и впоследствии попадать на сельскохозяйственные культуры. Следовательно, силос, как и другие корма для скота, может быть важным средством передачи возбудителей болезней на ферме [17]. Неадекватная ферментация силоса и плохое управление кормлением силоса способствуют размножению патогенов в силосе [17]. Наиболее распространенными патогенными микроорганизмами, обнаруживаемыми в силосе, являются *Escherichia coli*, особенно *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus sp.*, *Salmonella sp.* и *Clostridium sp.* [23].

На сегодняшний день хорошо известно, что основными возбудителями инфекций крупного рогатого скота являются следующие виды клостридий: *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. tetani*, *C. sordellii*, продуцирующие ряд опасных токсинов, интоксикация организма которыми нередко сопровождается летальным исходом [13]. Существует 5 определенных типов или генотипов *C. perfringens*: А, В, С, D, Е,

которые идентифицируются на основе токсинов, которые они продуцируют. Например, альфа-токсин (CPa), продуцируемый *Clostridium perfringens* типа А, вызывает газовую гангрену и мионекроз в инфицированных тканях, обладает гемолитической активностью. Клаудин 4 (CLDN4), продуцируемый *Clostridium perfringens*, вызывает накопление жидкости в кишечном тракте за счет изменения проницаемости мембран эпителиальных клеток кишечника. Токсин А *Clostridium difficile* (TcdA) представляет собой токсин, который обладает цитотоксичностью. Токсин действует путем модификации белков GTPase клетки-хозяина путем гликозилирования, что приводит к изменениям клеточной активности. Увеличение концентрации эндотоксинов в крови животных выше физиологической нормы приводит к патологическому состоянию — эндотоксиновой агрессии [13].

Важно отметить также отсутствие эффективных методов профилактики клостридиозов. Использование веществ, ингибирующих активность токсинов клостридий, таких, как 4-бромбензальдегид N-(2,6-диметилфенил) семикарбазон и аптамеров, уникальных олигонуклеотидов с высоким сродством к белкам организма - мишеням клостридий, слишком дорогостоящие методы для использования в животноводстве.

**Цель исследования.** Оценить наличие в консервированных кормах в хозяйствах Ленинградской области генов токсинов бактерий: шигатоксина (stx1, stx 2), интимина (eae), энтерогемолизина (ehxA) энтеробактерий; альфа токсина (cpa), бета токсина (cpb) и эпсилон токсина (etx) *C. perfringens*; бинарного токсина (cdtB), токсина А (tcdA) и В (tcdB) *C. difficile*.

### **Материалы и методы исследования**

Пробы силоса были отобраны на территории большинства районов в 17 хозяйствах Ленинградской области в Волосовском, Волховском, Всеволожском, Выборгском, Гатчинском, Киришском, Кировском, Тосненском и в Пушкинском районе г. Санкт-Петербурга. Отбор проб силоса из траншеи проводили с применением пробоотборника с максимально возможным при данных методах соблюдением условий асептики. Образцы были заморожены (-20°C) и переданы на сухом льду в лабораторию. Был проведен биохимический анализ кормов, оценены сырой протеин (ГОСТ 10846-91), клетчатка (ГОСТ 13496.2-91) и зола (ГОСТ 10847-74). Анализ проводили для среднесмешанной пробы из 3 точек отбора.

Тотальную ДНК из образцов силоса выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («ThermoFisher Scientific, Inc.», США)

согласно прилагаемой инструкции. Реакции амплификации проводили на амплификаторе DT Light («ДНК-Технология», Россия).

Праймеры для детекции генов токсинов энтеробактерий и клостридий в содержимом рубца и микроорганизмов в пробах кормов были разработаны с использованием программы NCBI/Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Анализ бактерий в пробах силоса проводили методом ПЦР с помощью «Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green» (ЗАО «Синтол», Россия) и праймеров (табл.1)

Таблица 1.

**Последовательности праймеров, использованных в исследовании**

Название	Последовательность (5'-3')	Длина п.н.
ehxA	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534
eae	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG GGCGTCATCA TAGTCTTTC	346
stx1a	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	478
stx2b	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251
cpb	TCCTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTGTATCCCA	611
etx	TGGGAACCTTCGATACAAGCA TTAACTCATCTCCCATAACTGCAC	396
cpa1	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324
tcdA	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTAA AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	629
tcdB	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	410
ctdB	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	262

Силос был проверен на присутствие генов шигатоксина (stx1, stx 2), интимина (eae), энтерогемолизина(ehxA) энтеробактерий; альфатоксина (cpa), бетатоксина (cpb) и эILON токсина (etx) *C. perfringens*; бинарного токсина (cdtB), токсина А (tcdA) и В (tcdB) *C. difficile*.

Амплификацию для последующего проведения NGS-секвенирования проводили с использованием ДНК-амплификатора Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью зубактериальных прай-

меров (IDT), 343F (5'-CTCCTACGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК. Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2 x 300 нт. Химерные последовательности были исключены из анализа с помощью программы «USEARCH 7.0» (<http://drive5.com/usearch/>). Обработка полученных ридов 2 x 300 нт происходила с помощью биоинформатической платформы «CLC Bio GW 7.0» («Qiagen», Нидерланды) и включала в себя перекрывание, фильтрацию по качеству (QV>15), триммирование праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводили с применением программы RDP Classifier. Статистическую обработку данных, построение диаграмм проводили с использованием программ Microsoft Excel и Past. Heatmap по семействам построен с учетом представленности при  $p \leq 0,05$  (рассчитано в пакете limma, в RStudio) при модерируемом t-тесте.

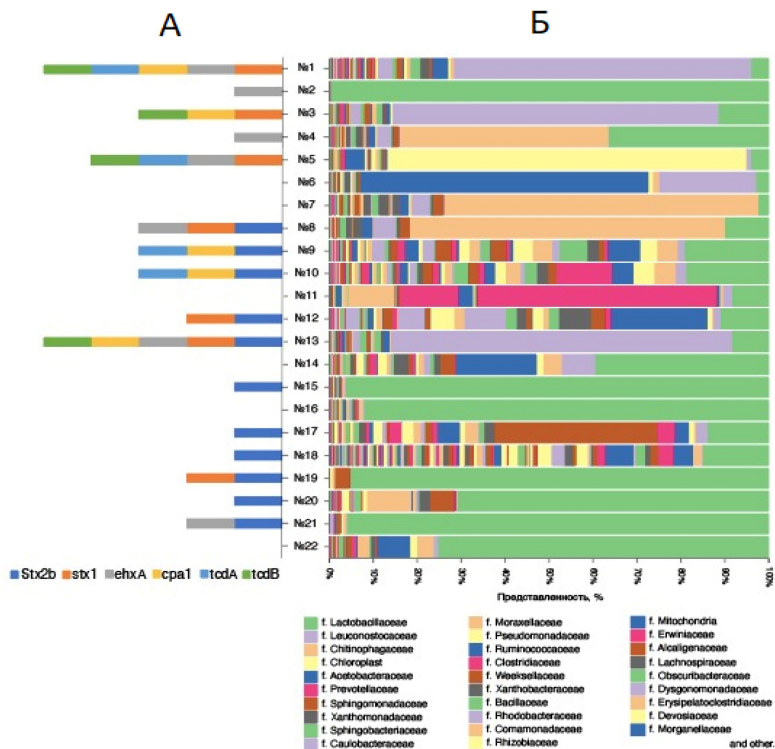
### Результаты исследования

При помощи метода ПЦР силос был исследован на присутствие генов шигатоксина (stx1, stx 2), интимина (eae), энтерогемолизина (ehxA) энтеробактерий; альфа токсина (cpa), бета токсина (cpb) и эpsilon токсина (etx) *C. perfringens*; бинарного токсина (cdtB), токсина А (tcdA) и В (tcdB) *C. difficile* (Рис.1). В результате гены интимина, бета токсина и бинарного токсина не были выявлены ни в одном из исследованных образцов. Наиболее загрязненными образцами, в которых были найдены 50% от общего числа исследованных токсинов, оказались образцы силосов №1 и №13 (были выявлены гены шигатоксинов обоих типов, энтерогемолизина, альфа токсина и токсинов А и В) и № 5 (были выявлены гены шигатоксинов обоих типов, энтерогемолизина, токсинов А и В. Нагрузкой в три разных токсина (или 30 % от общего числа проверенных токсинов) обладали силоса № 3, № 8, № 9 и № 10. Токсины не были выявлены в силосах № 6, №7, №11, № 14 и №16. Таким образом, значительно загрязненными токсинами были около 32% исследованных кормов (содержали в себе 3-5 генетических детерминант токсинов). Без токсинов было выявлено порядка 23% силосов.

Секвенирование микробного сообщества силоса показало, что в 73% исследованных силосов (№ 1-4, 9-11, 13-16 и 18-22) более 30% бактерий, входящих в сообщество, было представлено представителями фила Firmicutes, куда относятся молочные кислые лактобактерии. Высокая доля

Proteobacteria (более 30%) была выявлена в силосах №6, №9, №10, №12, №14, №17 и №18.

Более детальный анализ микробиоты силоса на уровне семейств показал, что Lactobacillaceae были доминирующим семейством в силосах №2, 4, 14, 15, 16, 19-22. Их доля варьировала в образцах от 35 до 99 %. Доминантным был род *Lactobacillus* во всех указанных выше образцах. Семейство порядка Lactobacilli Leuconostocaceae (род *Weissella*) доминировало в силосах №1 (67,6%), №3 (74,1%) и №13 (77,6%).



**Рис. 1.** А) Присутствие токсинов в силосах по результатам ПЦР, Б) Таксономическое разнообразие микробного сообщества силоса, полученного методом NGS секвенирования фрагмента гена 16S рРНК в хозяйствах Санкт-Петербурга и Ленинградской области. №1-22: номера образцов силоса.

В остальных силосах не было отмечено доминирование молочнокислых бактерий в эпифитном сообществе силоса. Представители сем.



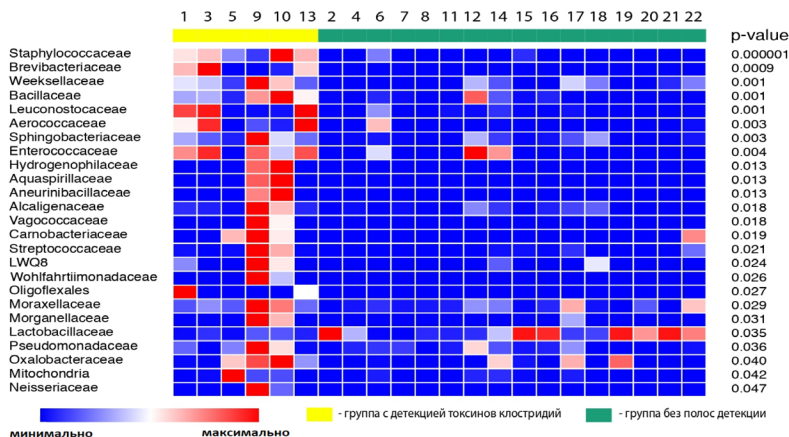
Chitinophagaceae доминировали в силосе №4 (47,7%), №7 (71,6%) и №8 (71,7%). В силосе №11 доминировали представители сем. Prevotellaceae (54,6%). В силосе № 17 доминировали представители Sphingomonadaceae (37,0%).

Таблица 2.

**Биохимическая характеристика образцов силоса**

№ пробы	Сырой протеин, %	Сырая клетчатка, %	Сырая зола, %
1	7,89	32,81	6,93
2	12,56	30,46	6,65
3	8,40	29,15	7,95
4	7,80	28,30	4,29
5	17,94	30,67	8,07
6	8,62	32,80	6,8
7	18,00	23,30	7,50
8	12,80	21,70	5,70
9	18,19	18,86	8,04
10	16,70	18,95	9,89
11	11,38	28,66	8,26
12	9,18	32,34	8,81
13	8,62	30,60	8,70
14	16,50	30,48	8,20
15	16,39	32,16	7,51
16	15,80	26,80	-
17	11,90	28,40	-
18	12,00	28,00	-
19	10,70	33,60	-
20	14,59	30,00	8,6
21	11,97	27,90	-
22	9,40	32,57	5,5

Согласно ГОСТ 55986—2014, некоторые силоса были определены как силоса 3 класса (табл.2), обладающие более низким качеством, по сравнению с другими силосами 1-2 класса. Наиболее низкими показателями качества обладали силоса № 1, 3, 6, 12, 13, 19 и 22. В них было выявлено низкое количество сырого протеина (менее 10%) и высокое содержание сырой клетчатки (более 31 %).



**Рис. 2.** Анализ достоверности взаимосвязи между таксономическим разнообразием эпифитного сообщества силоса и наличием/отсутствием генетических детерминант токсинов кластридий

Высокая нагруженность кластридиальными токсинами образцов силоса имела достоверную взаимосвязь с присутствием некоторых патогенных (*Staphylococcaceae*,  $p=0,000001$ ) и непатогенных микроорганизмов (*Brevibacteriaceae*,  $p=0,0009$ ; *Weeksellaceae*,  $p=0,001$ ; *Bacillaceae*,  $p=0,001$ ; *Leuconostocaceae*,  $p=0,001$ ; *Aerococcaceae*,  $p=0,003$ ; *Sphingobacteriaceae*,  $p=0,003$ ; *Enterococcaceae*,  $p=0,004$ ). Отсутствие молочнокислых бактерий сем. *Lactobacillaceae* также способствовало обнаружению большего числа бактериальных токсинов в силосе ( $p=0,04$ ).

### Обсуждение

Силос в настоящее время является наиболее распространенным консервированным кормом для скота во многих странах, включая Россию. Общий принцип силосования заключается в быстрой инактивации ферментных растительных систем и прекращении нежелательной микробной активности за счет создания анаэробных условий, развития молочнокислой микрофлоры и быстрого подкисления.

Нежелательная микрофлора может попадать на кормовые культуры во время уборки с почвой, которая может содержать различные патогенные микроорганизмы, в том числе кластридии и энтеробактерии, попадающие в нее при внесении на поля навоза в качестве удобрения [19]. Наиболее распространенными патогенными микроорганизмами, обнару-

живаемыми в силосе, являются *Escherichia coli*, особенно *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus sp.*, *Salmonella sp.* и *Clostridium sp.* [25].

Следует отметить, что в 64 % образцов силоса нами были выявлены гены токсинов энтеробактерий – шигатоксинов 1 и 2 типов. По мнению исследователей, наличие данных токсинов в кормах не всегда связано с заболеваниями животных. В Европе проводились исследования для оценки распространенности и свойств патогенных энтеробактерий у здоровых видов домашних животных, не страдающих диареей [2; 3]. Они показали, что крупный рогатый скот часто является носителем таких патогенных штаммов как STEC. Поэтому считается, что жвачные животные с бессимптомно протекающей инфекцией: крупный и мелкий рогатый скот являются главным резервуаром патогенных энтеробактерий [3]. Механизм передачи патогенных энтеробактерий между животными - фекальнооральный, реализуется при прямом контакте животных, через воду, при совместном кормлении, через зараженные пастбища и другие объекты окружающей среды.

Типичные штаммы патогенных энтеробактерий содержат ген *eae*, кодирующий синтез интимина (белка внешней мембраны клетки), участвующего в адгезии возбудителя к поверхности кишечного эпителия, а также ген *hly*, контролирующей продукцию энтерогемолизина.

В исследованных нами образцах силоса не был выявлен такой фактор вирулентности, как интимин (*eae*). Интимин представляет собой белок адгезина, необходимый для плотного присоединения энтеропатогенных штаммов кишечной палочки к клеткам-хозяевам в местах поражений. Он необходим для полной вирулентности при инфекциях человека и других животных. Исследования, проведенные на отдельных стадах или популяциях сельскохозяйственных животных, показали, что большинство изолятов крупного рогатого скота лишены основного дополнительного фактора вирулентности *eae* и *ehx* и, следовательно, не представляют потенциальной опасности для здоровья человека.

Таким образом, наличие только плазмидных генов шигатоксинов в образцах силоса не говорит об обязательной опасности данного корма в отношении зараженности патогенными для человека энтеробактериями.

Хорошо известно, что молочнокислые бактерии играют важную роль в ферментации силоса. Эпифитная микрофлора, микроорганизмы, естественным образом присутствующие в кормовых культурах, ответственны за ферментацию силоса, а также влияют на качество силоса [14].

Согласно полученным нами данным силоса, в основе микробного сообщества которых доминировали молочнокислые бактерии сем.

Lactobacillaceae, были наиболее безопасными с точки зрения нахождения в них генетических детерминант токсичности и лучшими по качеству кормов с биохимической точки зрения. Данные силоса или не содержали их совсем, или содержали в себе не более 1-2 детерминант токсичности. В то же время, отсутствие молочнокислых бактерий сем. Lactobacillaceae достоверно связано с обнаружением большего числа бактериальных токсинов в силосе ( $p=0,04$ ). Это еще раз подтверждает то, что силос может быть заражен патогенными штаммами *E. coli* [19], но быстрое падение pH во время силосования убивает *E. coli* в силосе, зараженном патогеном перед силосованием.

Клостридиоз – одна из распространенных инфекций у крупного рогатого скота [21]. К заражению восприимчивы телята до шести месяцев и высокопродуктивные животные после первого и второго отелов [6]. Клостридиоз чаще встречается в крупных молочных стадах, чем в мясных или смешанных.

Альфа-токсин *C. perfringens* является основным фактором патогенности газовой гангрены. Кодированный ген (*сра*) расположен в хромосомах, высококонсервативен и поэтому присутствует во всех штаммах *C. perfringens* [8]. Он был выявлен нами в 5 образцах силоса, большинство из которых (№1, 3 и 13) отличались более низкими показателями качества. Известно, что *C. perfringens* типа А повсеместно встречается в пищеварительной системе коров и считается нормальной микрофлорой при низких уровнях у здоровых жвачных [20]. Другие токсинотипы не обнаруживаются столь часто в окружающей среде или в образцах фекалий жвачных животных.

Второй основной токсин *C. perfringens*, кодируемый геном *срб*, – это бета-токсин. Он важен, поскольку участвует в некротическом энтерите у нескольких видов, включая крупный рогатый скот, и энтеротоксемии, такой как дизентерия ягнят [6]. Данный токсин не был выявлен ни в одном из исследованных образцов.

*Clostridium difficile* вызывает заболевания у разных видов животных, включая собак, лошадей, а также у молодняка – телят, ягнят, новорожденных поросят. Поражения у млекопитающих животных сходны с таковыми у человека, но их тяжесть и локализация в ЖКТ в значительной степени варьируются. Вирулентные штаммы *C. difficile* вырабатывают три токсина: энтеротоксин TcdA (токсин А), цитотоксин TcdB (токсин В) и бинарный токсин [1]. Гены бинарного токсина (*cdtB*) *C. difficile* не были выявлены ни в одном из исследованных образцов. Другие токсины *C. difficile*: токсин А (*tcdA*) и токсин В (*tcdB*) были выявлены в 27% образцах силоса.

Интересно отметить, что в наиболее загрязненных силосах доминировали представители семейства Leuconostocaceae порядка Lactobacilli, включающие в себя молочнокислые лактококки. Анализ показал, что высокая нагруженность клостридиальными токсинами имела прямую зависимость с Leuconostocaceae ( $p=0,001$ ). Доля бактерий сем. Leuconostocaceae достигала в образце №1 - 67,6%, №3 - 74,1% и №13 - 77,6%. Лактококки были представлены родами *Weissella* и *Leuconostoc* в этих образцах силоса. Доля *Leuconostoc* sp. была незначительной и не превышала 0,1%. Род *Weissella* включает грамположительные, каталазоотрицательные и неэндоспорообразующие кокковидные или палочковидные молочнокислые бактерии [4]. Обнаружено, что некоторые штаммы *Weissella* обладают пробиотической активностью [12]. Несмотря на эту положительную роль, было продемонстрировано, что штаммы *W. viridescens*, *W. cibaria* и *W. confusa* способны действовать как условно-патогенные микроорганизмы у человека, в то время как штаммы *W. paramesenteroides* и *W. cibaria* были изолированы из молока коров с клиническим маститом [24].

В целом лактококки, продуцирующие молочную кислоту, такие как, *Weissella*, являются основными компонентами микробной флоры различных типов кормовых культур. Цай и др. [5] исследовали большое количество кормовых культур и трав, а также обнаружили, что преобладающими LAB были кокки, продуцирующие молочную кислоту.

Присутствие бактерий, входящих в филу Bacteroides сем. Weeksellaceae и Sphingobacteriaceae, достоверно имели взаимосвязь с высоким уровнем токсинов в кормах ( $p=0,001$ ,  $p=0,003$  соответственно).

Высокая нагруженность клостридиальными токсинами образцов силоса также имела достоверную взаимосвязь с увеличением доли патогенных бактерий сем. Staphylococcaceae ( $p=0,000001$ ). В исследовании [22] было показано, что увеличение доли представителей сем. Lactobacillaceae привело к снижению относительной численности патогенных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* (<0,1% против 9,68%), *Staphylococcus epidermidis* (<0,1% против 9,46%) и *Streptococcus pneumoniae* (<0,1% против 8,53%) во время процесса силосования.

### Заключение

В результате анализа проб силосов из большинства районов Ленинградской области на присутствие генов шигатоксина (stx1, stx 2), интимина (eae), энтерогемолизина (ehxA) энтеробактерий; альфа токсина (cpa), бета токсина (cpb) и эpsilon токсина (ctx) *C. perfringens*; бинарного токсина

(cdtB), токсина А (tcdA) и В (tcdB) *C. difficile* при помощи метода ПЦР было показано, что образцы силоса загрязнены некоторыми генетически детерминантами токсичности бактерий. Гены интимина, бета токсина и бинарного токсина не были выявлены ни в одном из исследованных образцов. Сильно загрязненными токсинами были около 32% исследованных кормов (содержали в себе 3-5 генетических детерминант токсинов). Без присутствия токсинов было выявлено 23% силосов.

Анализ микробного сообщества силосов показал, что в силосах, содержащих наибольшую долю молочнокислых бактерий *Lactobacillus* sp., выявлялось меньшее число генов токсичности или они отсутствовали полностью. Силос обладал хорошим качеством, в отличие от силосов с высоким разнообразием генов токсичности. В силосах с высоким содержанием генов токсинов доля лактобацилл была минимальной, а доминирующими представителями были молочнокислые лактококки рода *Weissella*. Вероятно, бактерии рода *Lactobacillus* обладали высокой скоростью закисления среды, что способствовало снижению роста патогенной и нежелательной микрофлоры в силосе и, как следствие, отсутствию в нем токсинов.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Информация о спонсорстве.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №23-16-20007, <https://rscf.ru/project/23-16-20007/> и за счет гранта Санкт-Петербургского научного фонда №23-16-20007.

### *Список литературы / References*

1. Baker A.A., Davis E., Rehberger T., Rosener D. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the Midwest. *Appl. Environm. Microbiol.*, 2010, vol. 76(9), pp. 2961–2967. <https://doi.org/10.1128/AEM.02459-09>
2. Beutin L., Geier D., Zimmermann S., Aleksic S., Gillespie H.A., Whittam T.S. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol.*, 1997, vol. 63, no. 6, pp. 2175-2180. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2175-2180.1997>
3. Blanco M., Blanco J.E., Blanco J., Gonzalez E.A., Mora A., Prado C., Fernández L., Rio M., Ramos J., Alonso M.P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle.

- Epidemiol Infect.*, 1996, vol. 117, no.2, pp. 251-257. <https://doi.org/10.1017/S0950268800001424>
4. Björkroth J. A., Dicks L. M. T. D., Endo A. The genus *Weissella*. *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*, 2014, pp. 418–428. <https://doi.org/10.1002/9781118655252>
  5. Cai Y., Ohmomo S., Kumai S. Distribution and lactate fermentation characteristics of lactic acid bacteria on forage crops and grasses. *J Jpn Soc Grassl Sci.*, 1994, vol. 39(4), pp. 420–428. <https://doi.org/10.14941/grass.39.420>
  6. Chakravorty A. The pore-forming  $\alpha$ -toxin from *Clostridium septicum* activates the MAPK pathway in a Ras-c-Raf-dependent and independent manner. *Toxins (Basel)*, 2015, vol. 7(2), pp. 516–534. <https://doi.org/10.3390/toxins7020516>
  7. Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan Malo A.T., Harkin M.A. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol. Infect.*, 1997, vol. 119(2), pp. 245-250. <https://doi.org/10.1017/S0950268897007826>
  8. Cocolin L., Innocente N., Biasutti M., Comi G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International journal of food microbiology*, 2004, vol. 90(1), pp. 83-91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00296-4)
  9. Driehuis F. Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agricultural and Food Science*, 2013, vol. 22(1), pp. 16-34. <https://doi.org/10.23986/afsci.6699>
  10. Driehuis F., Wilkinson J.M., Jiang Y., Ogunade I., Adesogan A.T. Silage review: Animal and human health risks from silage. *J. Dairy Sci.*, 2018, vol. 101, pp. 4093-4110. <https://doi.org/10.3168/10.3168/jds.2017-13836>
  11. Fabiszewska A.U., Zielińska K.J., Wróbel B. Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2019, vol. 35(5). pp.76. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>
  12. Fusco V., Quero G.M., Cho G.S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C.M. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol.*, 2015, vol. 6, pp. 155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
  13. McQuirk S.M. Disease management of dairy calves and heifers. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 2008, vol. 24(1), pp.139-53. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.003>
  14. Muck R.E., Nadeau E.M.G., McAllister T.A., Contreras-Govea F.E., Santos M.C., Kung L. Jr. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci.*, 2018, vol. 101(5), pp. 3980-4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>

15. Ogunade I.M., Kim D.H., Jiang Y., Weinberg Z.G., Jeong K.C., Adesogan A.T. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. *J. Dairy Sci.*, 2016, vol. 99(6), pp. 4427-4436. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10766>
16. Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Elferink S., Spoelstra S.F. Microbiology of ensiling. *Silage science and technology*, 2003.
17. Pedroso A.F., Adesogan A.T., Queiroz O.C.M., Williams S. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: Efficacy and mode of action. *J. Dairy Sci.*, 2010, vol. 93(3), pp. 1098-1104. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2433>
18. Reich L.J., Kung Jr., L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2010, vol. 159(3-4), pp.105-109. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.002>
19. Russell J.B., Diez-Gonzalez F., Jarvis G.N. Potential effects of cattle diets on the transmission of pathogenic *Escherichia coli* to humans. *Microbes Infect.*, 2000, vol. 2(1), pp. 45-53. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00286-0)
20. Schlegel, B.J. Nowell V.J., Parreira V.R. Toxin-associated and other genes in *Clostridium perfringens* type A isolates from bovine clostridial abomasitis (BCA) and jejunal hemorrhage syndrome (JHS). *Canadian journal of veterinary research*, 2012, vol. 76(4), pp. 248–254.
21. Simpson K.M., Callan R.J., Van Metre D.C. Clostridial Abomasitis and Enteritis in Ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 2018, vol. 34(1), pp. 155–184. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.010>
22. Yin X., Fan Y., Tian R. Improving the quality and reducing harmful microbes of total mixed ration silage with dried soybean curd residue. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2023, vol. 10, pp. 86. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00461-0>
23. Vilar M.J., Yus E., Sanjuan M.L., Diequez F.J., Rodriguez-Otero J.L. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 2007, vol. 90(11), pp. 5083-5088. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0213>
24. Wald R., Baumgartner M., Urbantke V., Wittek T., Stessl B. Detection of *Weissella* spp. in milk samples of two dairy cows with clinical mastitis. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 2016, vol. 44(5), pp. 307-312. <https://doi.org/10.15653/TPG-160047>
25. Wilkinson J.M. Silage and health. Silage production in relation to animal performance, animal health, meat and milk quality. Proceedings of the 12th International Silage Conference, July 5–7, Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1999, pp. 67-81.



**ВКЛАД АВТОРОВ**

- Филиппова В.А.:** интерпретация результатов, подготовка текста статьи.  
**Йылдырым Е.А.:** общее руководство направлением исследования, интерпретация результатов.  
**Ильина Л.А.:** общее руководство направлением исследования, интерпретация результатов.  
**Лаптев Г.Ю.:** общее руководство направлением исследования, интерпретация результатов.  
**Дубровин А.В.:** отбор образцов, лабораторные исследования.  
**Заикин В.А.:** лабораторные исследования.  
**Калиткина К.А.:** лабораторные исследования.  
**Дубровина А.С.:** лабораторные исследования.  
**Малахов И.Г.:** отбор образцов, лабораторные исследования.  
**Ключникова И.А.:** лабораторные исследования.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

- Valentina A. Filippova:** interpretation of results, preparation of the text of the article.  
**Elena A. Yildirim:** general management of the research direction, interpretation of the results.  
**Larisa A. Ilina:** general management of the research direction, interpretation of the results.  
**Georgy Yu. Laptev:** general management of the research direction, interpretation of results.  
**Andrey V. Dubrovin:** sampling, laboratory studies.  
**Vasiliy A. Zaikin:** laboratory studies.  
**Ksenia A. Kalitkina:** laboratory studies.  
**Alisa S. Dubrovina:** laboratory studies.  
**Ivan G. Malakhov:** sampling, laboratory studies.  
**Irina A. Klyuchnikova:** laboratory research.

**ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ**

- Филиппова Валентина Анатольевна,** заведующий лабораторией кафедры крупного животноводства  
*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»;* *Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»*

*Петербургское шоссе, 2, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация; б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская Федерация  
filippova@biotrof.ru*

**Йылдырым Елена Александровна**, доктор биологических наук, профессор кафедры крупного животноводства  
*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
Петербургское шоссе, 2, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация; б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская Федерация  
deniz@biotrof.ru*

**Ильина Лариса Александровна**, доктор биологических наук, профессор кафедры крупного животноводства  
*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
Петербургское шоссе, 2, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация; б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская Федерация  
ilina@biotrof.ru*

**Лаптев Георгий Юрьевич**, доктор биологических наук; директор  
*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
Петербургское шоссе, 2, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация; б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская Федерация  
georg-laptev@rambler.ru*

**Дубровин Андрей Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории

*Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская  
Федерация  
dubrovin@biotrof.ru*

**Заикин Василий Александрович**, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории  
*Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская  
Федерация  
dfcx@biotrof.ru*

**Калиткина Ксения Андреевна**, аспирант факультета зооинженерии и биотехнологий  
*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»; Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
Петербургское шоссе, 2, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация; б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская Федерация  
kalitkina.xeniya@gmail.com*

**Дубровина Алиса Сергеевна**, биотехнолог молекулярно-генетической лаборатории  
*Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»  
б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская  
Федерация  
dasvet@biotrof.ru*

**Малахов Иван Георгиевич**, аспирант факультета зооинженерии и биотехнологий  
*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»  
Петербургское шоссе, 2, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация  
yo.vanya@mail.ru*

**Ключникова Ирина Александровна**, магистрант факультета зооинженерии и биотехнологий

*Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ»*

*б-р Загребский, 19, к. 1, г. Санкт-Петербург, 192284, Российская Федерация*

*klyuchnikova.irinaa@yandex.ru*

#### **DATA ABOUT THE AUTHORS**

**Valentina A. Filippova**, Head of the Laboratory of the Department of Large Animal Husbandry

*St. Petersburg State Agrarian University; LLC “BIOTROF”*

*2, Petersburg highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russian Federation; 19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*filippova@biotrof.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8789-9837>*

**Elena A. Yildirim**, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Large Livestock Husbandry

*St. Petersburg State Agrarian University; LLC “BIOTROF”*

*2, Petersburg highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russian Federation; 19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*deniz@biotrof.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5846-5105>*

**Larisa A. Ilina**, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Large Animal Husbandry

*St. Petersburg State Agrarian University; LLC “BIOTROF”*

*2, Petersburg highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russian Federation; 19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*ilina@biotrof.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2789-4844>*

**Georgy Yu. Laptev**, Doctor of Biological Sciences; Director

*St. Petersburg State Agrarian University; LLC “BIOTROF”*

*2, Petersburg highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russian Fed-*

*eration; 19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*georg-laptev@rambler.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8795-6659>*

**Andrey V. Dubrovin**, Candidate of Veterinary Sciences, Biotechnologist of the Molecular Genetic Laboratory

*LLC “BIOTROF”*

*19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*dubrovin@biotrof.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8424-4114>*

**Vasily A. Zaikin**, Biotechnologist of the Molecular Genetic Laboratory

*LLC “BIOTROF”*

*19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*dfcx@biotrof.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-8029-9955>*

**Ksenia A. Kalitkina**, Graduate Student of the Faculty of Animal Engineering and Biotechnology

*St. Petersburg State Agrarian University; LLC “BIOTROF”*

*2, Petersburg highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russian Federation; 19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*kalitkina.xeniya@gmail.com*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9541-6839>*

**Alisa S. Dubrovina**, Biotechnologist of the Molecular Genetic Laboratory

*LLC “BIOTROF”*

*19, build. 1, Zagrebky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*

*dasvet@biotrof.ru*

*ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-1879-7497>*

**Ivan G. Malakhov**, Postgraduate Student of the Faculty of Animal Engineering and Biotechnology

---

*St. Petersburg State Agrarian University*  
*2, Petersburg highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russian Federation*  
*yo.vanya@mail.ru*

**Irina A. Klyuchnikova**, Master's Student at the Faculty of Animal Engineering and Biotechnology  
*LLC "BIOTROF"*  
*19, build. 1, Zagrebsky Blvd., St. Petersburg, 192284, Russian Federation*  
*klyuchnikova.irinaa@yandex.ru*  
*ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-6484-1235>*

Поступила 15.11.2023

После рецензирования 16.02.2024

Принята 26.02.2024

Received 15.11.2023

Revised 16.02.2024

Accepted 26.02.2024