

УДК 579.62

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОМА МОЛОКА КОРОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ МАСТИТОМ

© 2021 г. К. К. Фурсова^{1,2}, С. Л. Соколов^{1,2,3}, М. П. Щанникова^{1,2*}, Д. А. Никанова¹,
О. А. Артемьева¹, Е. Н. Колодина¹, А. С. Сорокин⁴, Т. Р. Джелядин⁴, И. В. Шульчева^{1,2},
А. О. Шепеляковская², академик РАН А. Зиновьева¹, Ф. А. Бровко^{1,2}

Поступило 02.11.2020 г.
После доработки 27.11.2020 г.
Принято к публикации 28.11.2020 г.

Анализ микрофлоры молока от здоровых коров и с патологией мастита (клиническая и субклиническая формы) на фермах Центрального региона РФ показал, что у больных животных отмечается увеличение ОТЕ протеобактерий, относящихся в основном к *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, а также к *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Bacillaceae*. Доля ОТЕ *Planococcaceae* снижалась. У больных животных менялось соотношение редко представленных ОТЕ.

Ключевые слова: микробиом молока, мастит, омиксные технологии

DOI: 10.31857/S2686738921020086

Мастит крупного рогатого скота (КРС) — экономически значимое заболевание, уменьшающее продуктивность животных и качество молока [1]. Основные данные о микробном составе молока были получены методами классической микробиологии. Однако известна проблема оценки микробного состава, связанная с трудно-культивируемыми формами. На современном этапе широко используются омиксные технологии, позволяющие исследовать полный состав флоры и сделать предположения о связи объекта и запускаемого им процесса [2]. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ микробных композиций здоровых животных и животных с субклинической и клинической формами мастита.

Отбор проб молока проводился асептически на фермах Центрального региона РФ (Московская и Тульская область) в летний период 2018 г. от коров черно-пестрой голштинизированной породы из каждой доли вымени отдельно, через 60–70 дней после отела. Выборка коров сформирована на основании количества соматических клеток (SCC, клеток/мл) в молоке, которое оценивалось с помощью лазерной проточной цитометрии (Somacount-150, “Bentley Instruments”, США). Для настоящего исследования был отобран 31 образец, выделены группы: 1 — клинически здоровые животные (З), 10 образцов, SCC менее 1.00×10^5 ; 2 — субклинический мастит (С), 10 образцов, SCC 1.00×10^5 – 5.00×10^5 — клинический мастит (К), 11 образцов, SCC выше 1.00×10^6 .

Общая микробная ДНК выделялась из образцов с помощью набора Milk Bacterial DNA Isolation Kit (“Norgen Biotek”, Канада) в соответствии с инструкциями производителя. Варибельные области V3–V4 гена 16S рРНК амплифицировались с использованием набора универсальных праймеров. Библиотеку готовили по протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США) и секвенировали (MiSeq 2 × 250) [3].

Аннотирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью ресурса MG-RAST [4]. Для аннотирования была использована база данных GreenGenes (<https://greengenes.secondgenome.com>). Окончательный сравнительный анализ изменения количества ОТЕ (оперативных таксономических единиц) в структурах микро-

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, Россия

³ Федеральное государственное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр “Пушинский научный центр биологических исследований РАН” Федеральное государственное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия
*e-mail: mshannikova@mail.ru

Таблица 1. Наиболее распространенные ОТЕ в исследованных образцах (baseMean >1000.000). ggid – идентификационный номер нуклеотидной последовательности в базе данных Greengenes; baseMean – среднее нормализованное значение встречаемости ОТЕ, деленное на факторы размерности по всем образцам

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean
139717	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	48532.306
439966	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	31888.226
512109	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	31880.267
34155	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	26187.590
284012	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	25218.210
35834	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Oligella</i>	9871.205
136245	<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	7319.766
591807	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	6066.413
137946	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	5218.415
342500	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	4961.609
150126	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	4681.428
283209	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	3250.984
575037	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3180.100
30292	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	2986.131
152780	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	2886.250
8736	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	2873.531
242021	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Ralstonia</i>	2806.305
352959	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	2514.020
187243	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia glathei</i>	2417.492
546105	<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Facklamia</i>	2283.308
170909	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	2216.412
204877	<i>Burkholderiales</i>			2022.288
531620	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	1870.370
280267	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	1724.679
12332	<i>Actinomycetales</i>	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas</i>	1722.031
501234	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	1598.733
135979	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	1552.605
125947	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia bryophila</i>	1453.993
115314	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1410.329
292932	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Sutterella</i>	1242.447
151845	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	1222.461
240697	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1150.807
279311	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	1130.597
13438	<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	1111.792
109810	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	1084.266
589865	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	1067.272
329685	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfohalobiaceae</i>		1042.922

биомов был проведен при помощи программного пакета DESeq2 R [5]. (табл. 1–3).

Из полученных данных при сравнении групп З/К/С видно, что общего изменения по разнообразию микрофлоры не происходило. Во всех трех группах преобладает тип *Proteobacteria* (63.8–

87.2%), далее следует тип *Firmicutes* (11.6–35.2%). Известно, что у коров голштино-фризской породы в здоровом вымени преобладает тип *Firmicutes*, с преобладанием рода *Streptococcus* [6]. Можно предположить, что в нашем случае происходит вытеснение типа *Firmicutes* протеобактериями.

Таблица 2. ОТЕ, значение которых снижается при переходе от здоровых образцов молока к больным (З/С/М). ggid – идентификационный номер нуклеотидной последовательности в базе данных Greengenes; baseMean – среднее нормализованное значение встречаемости ОТЕ, деленное на факторы размерности по всем образцам; log2FoldChange – значение размера эффекта изменения встречаемости ОТЕ, выраженный в виде двоичного логарифма; lg p value – десятичный логарифм значимой вероятности (Р-значения)

клинически здоровые по сравнению с клиническим маститом (17 ОТЕs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
572224	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Trichococcus</i>	151.286	-26.453	-20.628
223893	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	17.547	-17.312	-12.719
5266	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>	32.933	-23.119	-7.654
159464	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus aminovorans</i>	22.007	-23.182	-7.296
112355	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	19.819	-5.472	-6.948
530933	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>		57.110	-11.031	-6.653
6847	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>		8.060	-20.870	-6.375
8111	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Candidatus Portiera</i>	20.674	-24.273	-6.380
204877	<i>Burkholderiales</i>			2022.288	-5.656	-5.978
73090	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>		90.466	-11.959	-5.583
233509	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	16.716	-3.915	-5.357
110075	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>BD2-13</i>	32.271	-6.277	-5.195
14872	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	906.487	-5.629	-4.719
299198	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	26.604	-4.228	-4.662
242021	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Ralstonia</i>	2806.305	-4.304	-4.199
159316	<i>Actinomycetales</i>	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Actinotalea</i>	25.134	-4.895	-4.149
465131	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>		11.105	-5.193	-4.139

клинически здоровые по сравнению с субклиническим маститом (9 ОТЕs)

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
223893	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	17.547	-14.705	-10.826
5266	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>	32.933	-20.643	-7.917
572224	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Trichococcus</i>	151.286	-14.406	-7.567
342500	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	4961.609	-6.407	-7.345
6847	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>		8.060	-19.274	-7.002
144654	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	98.700	-4.105	-3.962
240697	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1150.807	-4.472	-3.876
173367	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	354.915	-3.927	-3.713
327301	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>		48.307	-4.027	-3.649

субклинический мастит по сравнению с клиническим маститом (8 ОТЕs)

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
109019	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>		37.346	-23.106	-18.373
159464	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus aminovorans</i>	22.007	-36.753	-12.250
290481	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Kaistobacter</i>	31.143	-23.639	-10.977
363585	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>		15.914	-24.203	-8.879
141892	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>		4.011	-18.259	-6.244
289700	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	39.264	-4.626	-4.458
144702	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Ralstonia</i>	52.628	-7.459	-4.174
148758	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	705.344	-3.350	-3.015

Таблица 3. ОТЕ, значение которых повышается при переходе от здоровых образцов молока к больным (З/С/М). ggid – идентифицированный номер нуклеотидной последовательности в базе данных Greengenes; baseMean – среднее нормализованное значение встречаемости ОТЕ, деленное на факторы размерности по всем образцам; log2FoldChange – значение размера эффекта изменения встречаемости ОТЕ, выраженный в виде двоичного логарифма; lg p value – десятичный логарифм значимой вероятности (P-значения)

клинически здоровые по сравнению с клиническим маститом (2 ОТЕs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
12506	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>	17.759	20.787	–13.361
556122	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	14.382	20.824	–6.731
клинически здоровые по сравнению с субклиническим маститом (14 ОТЕs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
109019	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>		37.346	21.819	–27.672
290481	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Kaistobacter</i>	31.143	23.078	–18.134
266902	<i>Methylophilales</i>	<i>Methylophilaceae</i>	<i>Methylobacillus</i>	13.012	27.332	–14.487
247748				26.327	23.239	–14.310
363585	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>		15.914	20.666	–11.441
147889	<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Candidatus Phytoplasma</i>	9.155	20.826	–10.834
141892	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>		4.011	17.243	–9.566
12402	<i>Actinomycetales</i>			8.049	18.849	–6.445
542062	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	3.518	14.712	–4.424
182827	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	<i>Nevskia</i>	29.578	8.187	–4.363
98908	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>		46.788	6.249	–3.814
366394	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>	26.400	4.113	–3.685
525865	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	7.052	6.487	–3.295
137283	<i>Bacillales</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	6.539	6.301	–3.250
субклинический мастит по сравнению с клиническим маститом (16 ОТЕs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
572224	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Trichococcus</i>	151.286	27.342	–13.885
279973	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	9.330	18.071	–9.677
13949	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	5.039	21.438	–8.982
560590	<i>Actinomycetales</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Janibacter</i>	30.283	20.901	–8.667
324188	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>	17.330	21.086	–7.827
593609	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	17.236	18.423	–7.495
592739	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Oleibacter</i>	10.695	19.170	–7.218
253764	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	13.625	17.358	–6.835
538247	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>		35.250	17.906	–6.385
351345	<i>Alteromonadales</i>	<i>Idiomarinaceae</i>	<i>Pseudidiomarina</i>	43.403	22.798	–5.596
544146	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Coprococcus</i>	3.551	17.983	–4.913
163187	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>		13.517	16.409	–4.803
240697	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1150.807	6.599	–4.400
153024	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	8.683	19.990	–3.826
91742	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Pseudaminobacter</i>	32.544	16.299	–3.536
342500	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	4961.609	5.125	–2.855

Так, при переходе от З к С значительно увеличивается содержание бактерий *Pseudomonadales* (26.8–42.9%) и *Burkholderiales* (24.3–37.2%). Среди представителей этих отрядов описаны возбудители мастита [7].

Уровень ОТЕ отряда *Bacillales* в трех группах примерно одинаковый. Однако при переходе от уровня отряда к семействам видно, что сем. *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Bacillaceae* возрастают у больных животных. Представители этих

семейств описаны как основные возбудители воспалительных заболеваний КРС, в том числе мастита. Так, в качестве основных патогенов, ассоциированных с маститом, в литературе описаны *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* [8], хотя внутри семейств наблюдаются различия в представителях [9].

В нашем случае высокая доля бактерий семейства *Aerococcaceae* сохранялась во всех трех категориях, доля *Planococcaceae* понижалась в образцах К/С. Ранее *Aerococcaceae* и *Planococcaceae* описаны как основные представители микрофлоры молока здоровых коров [10]. *Planococcaceae* также представлены в кишечнике КРС и составляют до 18% фекальной бактериальной популяции [11].

При рассмотрении семейства *Staphylococcaceae* во всех группах доминирует патоген *S. sciuri*. Кроме того, во всех образцах молока встречаются *Macrococcus caseolyticus*. По своим свойствам эти два вида, ранее относящиеся к роду *Staphylococcus*, близки, идентичность нуклеотидных последовательностей их генов 16S рРНК составляет >95.5% [12]. Поэтому мы рассматриваем *S. sciuri* и *M. caseolyticus* как группу *S. sciuri*.

Анализ присутствия *Staphylococcaceae* в пробах показал, что в отдельных образцах с увеличением SCC возрастает содержание *S. haemolyticus*. В то же время наибольшее количество *S. haemolyticus* находится в пробе с SCC=2.87 × 10⁶, тогда как в пробе со значением SCC=5.19 × 10⁶ присутствие *S. haemolyticus* незначительно. Содержание *S. haemolyticus* также различается в пробах молока, взятых из разных долей вымени у одного животного с примерно одинаковым значением SCC. Поэтому мы не можем однозначно утверждать, что увеличение SCC коррелирует с увеличением количества *S. haemolyticus*.

S. epidermidis обнаружен в большинстве исследованных образцов и в некоторых случаях содержится на высоком уровне. В отдельных образцах молока обнаружен *S. aureus*.

При сравнении количественных и качественных изменений микробиома для субклинической формы и клинического мастита не обнаруживаются изменений среди наиболее распространенных ОТЕ (baseMean >1000.000) (дополнительные материалы статьи). Однако среди ОТЕ с меньшим распространением такие изменения есть. Замечено, что при переходе от образцов З к С/К уменьшается число *Burkholderiales*, в то время как увеличивается присутствие *Actinomycetales*.

Хотя представители этих отрядов описаны как представители нормальной микрофлоры молока, ряд видов *Actinomycetales* являются патогенами, ассоциированными с маститом [13].

Интересно, что во всех образцах обнаруживается в значительных количествах *Pseudomonas viridiflava*. Этот микроорганизм до сих пор обнару-

живался исключительно на растениях [14], и ранее не был замечен в молоке коров. Возможно, *P. viridiflava* могут попадать в молоко извне через протоки молочной железы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 20-16-00106.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heikkilä A.M., Nousiainen J.I., Pyörälä S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 1. P. 139–150.
2. Knight R., Vrbanac A., Taylor B.C., et al. Best practices for analysing microbiomes // Nat. Rev. Microbiology. 2018. V. 16. № 7. P. 410–422.
3. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // Nucleic Acids Research. 2013. V. 41. № 1. P. e1.
4. Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. № 1. P. 386.
5. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biology. 2014. V. 15. № 550.
6. Cremonesi P., Ceccarani C., Curone G., et al. Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows // PLoS One. 2018. V. 13. № 10. P. e0205054
7. Plummer P.J., Plummer C. Diseases of the Mammary Gland. // Sheep and Goat Medicine. 2012. P. 442–465.
8. Keane O.M. Symposium review: Intramammary infections – Major pathogens and strain-associated complexity // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 5. P. 4713–4726.
9. Condas L., De Buck J., Nobrega D.B., et al. Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds // J Dairy Sci. 2017. V. 100. № 7. P. 5592–5612.
10. Ganda E.K., Bisinotto R.F., Lima S.F., et al. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin // Scientific Reports. 2016. V. 6. P. 37565. <https://doi.org/10.1038/srep37565>
11. Korsak N., Taminiou B., Hupperts C. et al., Assesment of bacterial superficial contamination in classical or ritually slaughtered cattle using metagenetics and microbiological analysis // Int J Food Microbiol. 2017. V. 17. № 247. P. 79–86.
12. Kloos W.E., Ballard D.N., George C.G., et al. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperficus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. no. and *Macrococcus carouelicus* sp. nov. // Int J Syst Bacteriol. 1998. V. 48. Pt 3. P. 859–877. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-859>

13. *Hamid M.E.* Dietzia species as a cause of mastitis: Isolation and identification of five cases from dairy cattle // *African Journal of Microbiology Research*. 2013. V. 7. № 29. P. 3853–3857.
14. *Sarris P.F., Trantas E.A., Mpalantinaki E., et al.* *Pseudomonas viridiflava*, a Multi Host Plant Pathogen with Significant Genetic Variation at the Molecular Level // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. P. e36090.

CHANGES IN THE MICROBIOME OF MILK IN COWS WITH MASTITIS

**K. K. Fursova^{a,b}, S. L. Sokolov^{a,b,c}, M. P. Shchannikova^{a,b,#}, D. A. Nikanova^a, O. A. Artem'eva^a,
E. N. Kolodina^a, A. S. Sorokin^d, T. R. Dzhelyadin^d, I. V. Shulcheva^{a,b}, A. O. Shepelyakovskaya^b,
Academician of the RAS N. A. Zinovieva^a, and F. A. Brovko^{a,b}**

^a *L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Moscow, Russian Federation*

^b *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

^c *FRC PRCBR, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry & Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

^d *FRC PRCBR, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

[#] *e-mail: mshannikova@mail.ru*

Analysis of the milk microbiomes from healthy cows and cows with different forms of mastitis (clinical and subclinical) on two farms of the Central Russia was conducted. Increasing of phylum *Proteobacteria* mainly related to *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, as well as *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, and *Bacillaceae* was detected in animals with mastitis. *Planococcaceae* OTUs percentage has been decreased at the same time. The ratio of rarely presented OTUs was changed also in the milk from animals with mastitis.

Keywords: milk microbiome, mastitis, omix technologies