

ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СОДЕРЖАНИЯ

© 2024 г. Ш. А. Бегматов^{а, *}, А. В. Белецкий^а, А. Л. Ракитин^а, А. П. Лукина^б,
Л. О. Соколянская^б, А. В. Ракитин^б, Л. Б. Глухова^б, А. В. Марданов^а,
О. В. Карначук^б, Н. В. Равин^а

^аИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071

^бТомский государственный университет, Томск, 634050

*e-mail: shabegmatov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.04.2024 г.

После доработки 13.06.2024 г.

Принята к публикации 15.06.2024 г.

Резистентность к противомикробным препаратам – актуальная проблема не только здравоохранения, но и животноводства. Широкое применение противомикробных препаратов в составе кормовых добавок относится к одной из основных причин быстрого распространения резистентности представителей микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных. Для характеристики генов антибиотикорезистентности (резистомы) мы провели метагеномный анализ фекалий 24 голов крупного рогатого скота (КРС) из разных регионов России и Казахстана, включая коров разных пород и яков. Они различались по способу разведения: отгонно-пастбищное с круглогодичным нахождением на пастбищах или стойловое, когда животные получают кормовые добавки. Хотя в образцах обеих групп животных были обнаружены гены устойчивости к аминогликозидам, β-лактамам, гликопептидам, антибиотикам МЛС-группы (макролиды, линкозамиды и стрептограммины), фениколам и тетрациклинам, содержание резистомы в микробиоме фекалий КРС, разводимых в стойловых условиях, было примерно в 10 раз выше, чем у животных, содержащихся на пастбищах. В резистоме стойловых КРС доминировали β-лактамазы и гены устойчивости к тетрациклинам, содержание которых в микробиоме было соответственно в 24 и 60 раз выше, чем у животных, содержащихся на пастбищах. По-видимому, распространение устойчивости к β-лактамам и тетрациклинам у КРС, разводимого в стойловых условиях, отражает активное использование этих антибиотиков в животноводстве. Метагеномный анализ фекалий сельскохозяйственных животных может быть использован для количественного определения генов антибиотикорезистентности с целью мониторинга антибиотиков, применяемых при содержании животного.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, животноводство, антибиотики, антибиотикорезистентность, метагеномика, микробиом, яки, коровы

DOI: 10.31857/S0026898424060105, **EDN:** IALWAS

ВВЕДЕНИЕ

Проблема резистентности к противомикробным препаратам актуальна не только для здравоохранения, но и в сельском хозяйстве, в частности в животноводстве. В настоящее время наблюдается быстрый рост числа штам-

мов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1]. Серьезную озабоченность вызывают устойчивые к лекарственным препаратам штаммы *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Эти виды бактерий не только возбудители рас-

Сокращения: АРГ – гены резистентности к антибиотикам; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КРС – крупный рогатый скот; МЛС – макролиды, линкозамиды и стрептограммины; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ОТЕ – оперативные таксономические единицы; MAG (metagenome assembled genome) – геном, собранный из метагенома.

пространенных инфекционных заболеваний, но и источники генов резистентности к антибиотикам (АРГ), в основном полученных в результате горизонтального переноса [2]. Общий экономический ущерб от этих резистентных бактерий только в США составляет 2.8 млрд долларов ежегодно [3].

Широкое применение противомикробных препаратов в животноводстве — в составе кормовых добавок и в качестве ветеринарных препаратов — считается одной из основных причин быстрого роста числа мультирезистентных штаммов [4]. Использование антибиотиков в животноводстве значительно превышает масштаб их использования в медицине. Нельзя отрицать тот факт, что благодаря их применению стало возможным интенсивное животноводство. По прогнозам, к 2030 году потребление антибиотиков в животноводстве увеличится на 67% во всем мире и почти удвоится в Бразилии, России, Индии, Китае и Южной Африке [5]. Проблема распространения резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов у сельскохозяйственных животных не ограничивается собственно сферой животноводства, поскольку устойчивые бактерии и гены резистентности могут передаваться человеку либо с пищей, либо через окружающую среду, в которую попадают отходы жизнедеятельности животных (навоз и др.) [1].

Микробиом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) сельскохозяйственных животных относится к важным факторам их нормальной жизнедеятельности, обеспечивая переваривание корма и усвоение питательных веществ. Микробные сообщества ЖКТ травоядных обеспечивают гидролиз сложных растительных полисахаридов, включая целлюлозу и различные гемицеллюлозы. Микробиоту ЖКТ составляют эукариоты (грибы, простейшие), археи и бактерии в концентрациях порядка 10^4 , 10^6 и 10^{10} соответственно [6]. Высокая концентрация микроорганизмов создает благоприятные условия для горизонтального переноса генов внутри микробного сообщества и формирования (мульти)резистентных штаммов в условиях селективного давления, обусловленного присутствием антибиотиков в ЖКТ.

Метагеномный анализ позволяет выявлять набор генов, имеющих в микробном сообществе, без культивирования отдельных штаммов микроорганизмов и благодаря этому широко используется для характеристики резистома (совокупности генов устойчивости к антибиотикам) в микробиоте ЖКТ сельскохозяйственных животных. Так, в 2020 году S. Lim и др. [7] сообщали о результатах метагеномного анализа микробиома ЖКТ 36 свиней и 41 особи круп-

ного рогатого скота (КРС) на фермах в Корее. Авторы обнаружили, что гены, кодирующие устойчивость к аминогликозидам, β -лактамам, линкозамидам, стрептограминам и тетрациклинам преобладали в резистомах как свиней, так и КРС. Тогда же Z. Zhu и соавт. [8] секвенировали метагеномы ЖКТ 30 голов коров и яков и выявили 42 типа АРГ, причем разнообразие и численность последних у яков были значительно ниже, чем у коров. Значительная часть АРГ была связана с интегронами, что указывало на роль горизонтального переноса в распространении генов резистентности. Недавно, в 2023 году, вышла работа W. Wang и др. [9] по исследованию резистома ЖКТ коров с помощью метагеномного анализа. В 40 образцах фекалий было выявлено 1688 АРГ, которые могут обеспечивать устойчивость к тетрациклину, хинолонам, β -лактамам и аминогликозидам, широко используемым в медицине и ветеринарии.

Хотя проблема распространения резистентности к антибиотикам в сфере животноводства актуальна и для Российской Федерации, такие исследования с применением методов метагеномики остаются немногочисленными. Большинство работ сфокусировано на выделении отдельных чистых культур микроорганизмов и проверке их устойчивости к антибиотикам классическими микробиологическими методами, что не дает полной информации о резистоме микробиоты ЖКТ в целом. В результате проведенного нашей исследовательской группой метагеномного анализа навозохранилища крупного свиноводческого хозяйства обнаружено несколько сот АРГ, среди которых преобладали гены, обеспечивающие устойчивость к тетрациклинам, антибиотикам МЛС-группы и аминогликозидам [10].

В представленной работе мы использовали метагеномный анализ для характеристики состава резистома микробиоты кишечника КРС, содержащегося в разных условиях. В качестве объектов исследования мы выбрали три группы животных: (1) КРС (*Bos taurus*, коровы и быки) галловейской породы, (2) яки (*Bos grunniens*) и (3) КРС из агроферм и частных хозяйств разных регионов. Первые две группы животных разводили отгонно-пастбищным способом в экологически чистом регионе горного Алтая, а третья группа животных объединяла КРС, выращиваемый стойлово-пастбищным методом и получающий кормовые добавки, которые могли содержать антибиотики. В связи с тем, что развитие устойчивости к антибиотикам — естественный процесс и встречается в природных условиях, мы считали, что резистом галловейских КРС и яков представляет собой “естественный” фон, а “стойловых” КРС — ре-

зистом, обогащенный генами устойчивости к антибиотикам, применяемым в кормовых добавках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал исследования. Исследованные образцы фекалий были собраны в частных хозяйствах разных регионов Российской Федерации и Казахстана в ноябре–декабре 2021 года

(табл. 1). Образцы фекалий галловейского КРС (3 пробы) и яков (3 пробы), находившихся на круглогодичном свободном выпасе, отбирали из разных точек пастбища — чтобы минимизировать вероятность сбора образцов от одного и того же животного. Температура воздуха во время отбора проб составляла от -15°C до -20°C , что обеспечивало быстрое естественное замораживание фекалий. Остальные образцы фекалий коров (18 проб) собирали от разных животных, содержа-

Таблица 1. Места сбора образцов фекалий животных

Идентификатор образца	Животное	Географическая локация	Координаты
KG220	КРС, <i>B. taurus</i> , галловейская порода, возраст и пол неизвестны	с. Черга, Шебалинский район, Республика Алтай	51.517429 N, 85.542328 E
KG226	КРС, <i>B. taurus</i> , галловейская порода, возраст и пол неизвестны	с. Черга, Шебалинский район, Республика Алтай	51.517429 N, 85.542328 E
KG228	КРС, <i>B. taurus</i> , галловейская порода, возраст и пол неизвестны	с. Черга, Шебалинский район, Республика Алтай	51.517429 N, 85.542328 E
KY236	Як, <i>B. grunniens</i> , возраст и пол неизвестны	урочище Уландрык, Кош-Агачский р-н, Республика Алтай	49.5826700 N, 89.0067260 E
KY245	Як, <i>B. grunniens</i> , возраст и пол неизвестны	урочище Уландрык, Кош-Агачский район, Республика Алтай	49.5826700 N, 89.0067260 E
KY254	Як, <i>B. grunniens</i> , возраст и пол не известны.	урочище Уландрык, Кош-Агачский район, Республика Алтай	49.5826700 N, 89.0067260 E
KA0046	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет	Фатежский район, Курская область	52.0817561 N, 35.8284784 E
KA0047	КРС, <i>B. taurus</i> , бык, 5 лет, симментальская порода	Фатежский район, Курская область	52.0817561 N, 35.8284784 E
KA0049	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, симментальская порода	Фатежский район, Курская область	52.0817561 N, 35.8284784 E
KA0050	КРС, <i>B. taurus</i> , бык, 1 год, порода неизвестна	Чермисиновский район, Курская область	51.9307859 N, 37.2833153 E
KA0045	КРС, <i>B. taurus</i> , возраст, пол и порода неизвестны	Чермисиновский район, Курская область	51.9307859 N, 37.2833153 E
KA00821	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 3 года, голштинская порода, агроферма	Искитимский район, Новосибирская область	55.0953625 N, 80.9652734 E
KA00841	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, голштинская порода, возраст неизвестен	Искитимский район, Новосибирская область	55.0953625 N, 80.9652734 E
KA0106	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 3 года, голштинская порода, агроферма	Искитимский район, Новосибирская область	55.0953625 N, 80.9652734 E
KA0036	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 7 лет, краснопестрая порода	с. Троицкое, Омская область	54.86845000 N, 73.30630036 E
KA0038	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 9 лет, краснопестрая порода	с. Троицкое, Омская область	54.86845000 N, 73.30630036 E
KA0021	КРС, <i>B. taurus</i> , бык, 3 года, симментальская порода	Альшеевский район, Республика Башкортостан	53.8834471 N, 54.6000000 E
KA0024	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 7 лет, симментальская порода	Альшеевский район, Республика Башкортостан	53.8834471 N, 54.6000000 E
KA0029	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, симментальская порода	Альшеевский район, Республика Башкортостан	53.8834471 N, 54.6000000 E

Окончание таблицы 1

Идентификатор образца	Животное	Географическая локация	Координаты
КА0037	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, айрширская порода, частное хозяйство	Уалихановский район, Казахстан	53.9798286 N, 73.0993498 E
КА0040	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 1 год, чернопестрая порода, частное хозяйство	Уалихановский район, Казахстан	53.9798286 N, 73.0993498 E
КА0075	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, чернопестрая порода, агроферма	Увимский район, Республика Удмуртия	57.032200 N, 52.314700 E
КА0076	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 1 год, чернопестрая порода, частное хозяйство	Увимский район, Республика Удмуртия	57.032200 N, 52.314700 E
КА0079	КРС, <i>B. taurus</i> , корова, 5 лет, чернопестрая порода, агроферма	Увимский район, Республика Удмуртия	57.032200 N, 52.314700 E

щихся на фермах и в частных хозяйствах. После отбора пробы замораживали в мобильной морозильной камере, поддерживающей температуру -20°C , а после доставки в лабораторию хранили при -80°C до выделения ДНК.

Выделение ДНК. Препараты суммарной ДНК из фекалий выделяли с помощью наборов Power Soil kit (“Qiagen”, Германия). Количество метагеномной ДНК определяли с помощью наборов Qubit dsDNA HS Assay kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Из каждого образца выделяли >5 мкг ДНК, что было достаточно для работ по секвенированию метагеномов.

Аmplification фрагментов гена 16S рРНК, секвенирование и бionформатическая обработка данных. Варибельный V3–V4 район гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров: 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWSCAG) и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHTCTAAT) [11]. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с использованием Agencourt AMPure Beads (“Beckman Coulter, Brea”, США), концентрацию измеряли с помощью Qubit dsDNA HS Assay kit (“Invitrogen”, США). Очищенные ПЦР-фрагменты использовали для приготовления библиотек секвенирования с помощью наборов Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США). ПЦР-фрагменты секвенировали на Illumina MiSeq (2×300 нуклеотидов с двух сторон). Парные чтения объединяли с помощью FLASH v.1.2.11 [12]. После исключения чтений низкого качества и “химер”, чтения всех образцов кластеризовали в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) с минимальной идентичностью 97%, что соответствует уровню вида. Для определения доли ОТЕ в каждом из образцов на их репрезентативные последовательности накладывали исходные чтения с минимальной идентичностью 97% по всей длине. Для выполнения

всех этих процедур использовали пакет программ USEARCH v.11 [13]. Таксономическую идентификацию бактерий и архей по последовательностям генов 16S рРНК проводили с использованием алгоритма VSEARCH v.2.14.1 [14] по базе данных SILVA v.138 [15].

Секвенирование и сборка метагеномов. Для приготовления библиотек для секвенирования метагеномной ДНК использовали наборы NEBNext Ultra II DNA Library prep kit (“NEB”, США). Полученные библиотеки секвенировали на Illumina NovaSeq 6000 в формате парных чтений (2×150 н.). Удаление адаптеров и исключение низкокачественных последовательностей ($Q < 30$) выполнены с использованием Cutadapt v.1.8.3 [16] и Sickel v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>, доступен 29.05.2024) соответственно. Сборку контигов проводили с помощью программного пакета MEGANIT v.1.2.9 [17]. Сборку геномов из метагеномов (metagenome assembled genome, MAG) проводили с использованием MetaBAT v.2.2.15 [18]. Полноту MAG и их возможную контаминацию (избыточность) оценивали с помощью CheckM v.1.1.3 [19]. Собранные MAG были таксономически идентифицированы с использованием программного пакета GTDB-Tk v.1.5.0 [20] и базы данных геномной таксономии (genome taxonomy database, GTDB) [21].

Чтения, относящиеся к генам 16S рРНК бактерий и архей, были определены наложением на базу данных SILVA v.138 программой Bowtie2 [22] с минимальной гомологией 90%.

Поиск и аннотация генов устойчивости к антибиотикам. Открытые рамки считывания (ОРС) в контигах идентифицировали с использованием программы Prodigal v2.6.3 [23]. Для идентификации предполагаемых АРГ предсказанные белковые последовательности ОРС сравнивали с базой данных генов устойчивости к антибиотикам NCBI с использованием программы

NCBI AMRFinderPlus v.3.11.4. (<https://github.com/ncbi/amr/wiki>, доступен 29.05.2024) на командной строке с параметром “-p” [24].

Информация о доступности полученных последовательностей фрагментов гена 16S рНК и метагеномов. Первичные последовательности фрагментов гена 16S рНК и метагеномов фекалий животных депонированы в базе NCBI Sequence Read Archive (SRA) и доступны в BioProject PRJNA785979.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разнообразие и состав микробиоты

Для характеристики микробиоты ЖКТ 24 животных (3 КРС галловейской породы, 3 яка и 18 “стойловых” особей КРС) было идентифицировано 433315 последовательностей фрагментов гена 16S рНК (от 9735 до 58722 на образец). Результаты кластеризации последовательностей ампликонов гена 16S рНК показали, что число обнаруженных ОТЕ на уровне вида составляло от 1.80 до 3.25 тыс. Оценка альфа-разнообразия по индексу Shannon не выявила существенных отличий между микробными сообществами исследованных животных (значение shannon_e в диапазоне 4.14–5.64).

В микробных сообществах ЖКТ животных доминирующими были филумы Firmicutes (в среднем 59.2, 49.6 и 50.7% для галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС соответственно) и Bacteroidota (25.1, 31.2 и 33.3% соответственно) (рис. 1). Среди других отно-

сительно многочисленных групп обнаружены бактерии филумов Verrucomicrobiota (4.2–7.4%), Proteobacteria (1.5–3.1%), Cyanobacteria (1.2–3.3%), Spirochaetota (0.2–1.6%). Заметные отличия между (i) галловейским КРС и яками и (ii) “стойловым” КРС зарегистрированы для метаногенных архей, которых в первой группе было в несколько раз больше. Так, содержание Euryarchaeota у галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС составляло 1.8, 1.7 и 0.4%, а Halobacterota – 1.1, 0.7 и 0.3% соответственно.

Разнообразие резистомы

В результате секвенирования метагеномов 23 образцов фекалий животных определено от 8.8 до 22.3 млрд нуклеотидов, собрано от 0.93 до 6.0 млн контигов с длиной N50 от 606 до 2584 нуклеотидов. Еще для одного образца (КА0029) секвенировано около 1 млрд нуклеотидов, собрано 159 тыс. контигов (N50–606 нуклеотидов). В этих контигах суммарно предсказано 1565 генов устойчивости к антибиотикам – от 13 до 147 на образец. В связи с тем, что объем секвенирования и суммарная длина собранных контигов для разных образцов существенно отличались, в дальнейшем при сравнении образцов число генов резистентности нормировали на 10^9 нуклеотидов суммарной длины собранных контигов (рис. 2). По этому показателю микробиоты трех групп животных существенно отличались: минимальное содержание АРГ идентифицировали у яков (9.8–14.6, в среднем 11.35 АРГ/ 10^9 нуклеотидов), более высокое у галловейского КРС (15.8–21.9, в среднем 18.5 АРГ/ 10^9 нуклеотидов) и наибольшее у “стойлового” КРС (21.7–68.0, в среднем 38.9 АРГ/ 10^9 нуклеотидов, без учета образца КА0029). В образце КА0029 выявлено аномально высокое число АРГ – 138.8 АРГ/ 10^9 нуклеотидов – в сочетании с их низким разнообразием. Скорее всего, это связано с недостаточным объемом метагеномного секвенирования, что стало причиной исключения образца КА0029 из дальнейшего анализа разнообразия АРГ. Абсолютное большинство АРГ относилось к 9 семействам (рис. 2): аминогликозид-фосфотрансферазы, белки защиты рибосомы ABC-F типа (ABC-F type ribosomal protection protein), кластер генов устойчивости к гликопептидам (Van), хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, линкозамид-нуклеотидилтрансферазы, металло-β-лактамазы, β-лактамазы класса А, обеспечивающий устойчивость к тетрациклину белок защиты рибосом (tetracycline-resistant ribosomal protection protein) и стрептограмин-ацетилтрансферазы (Vat). Гены восьми из девяти семейств встречались во всех трех группах животных. Гены белка защиты рибосом, обеспечивающего устойчивость к тетра-

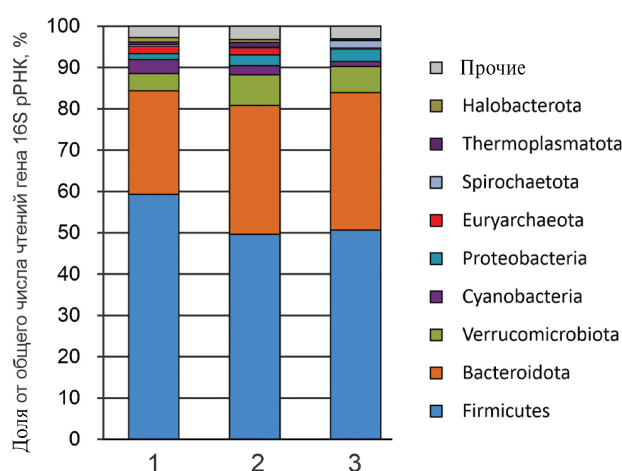


Рис. 1. Таксономический состав микробных сообществ образцов фекалий галловейского КРС (1), яков (2) и “стойлового” КРС (3). На рисунке представлены филумы, средняя доля которых в сообществах составляет не менее 1%.

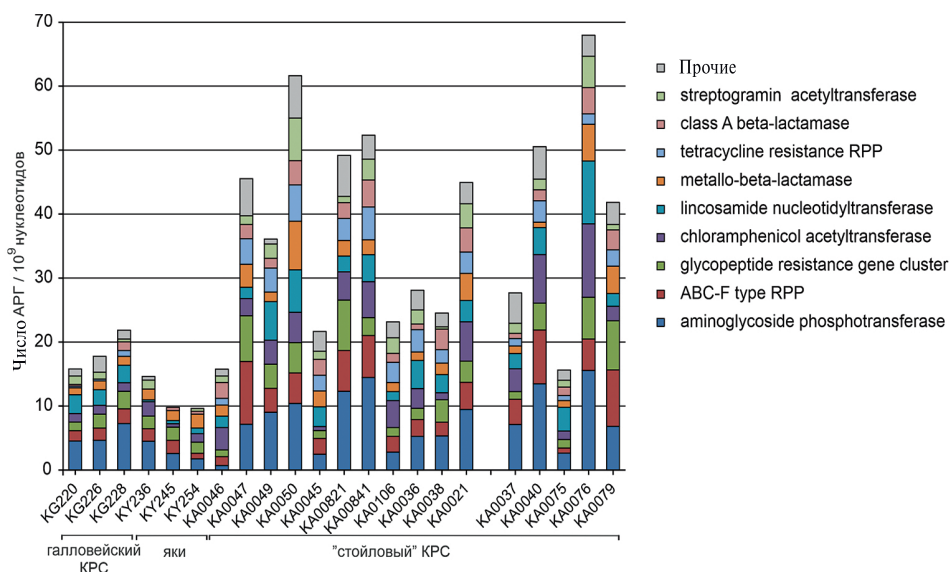


Рис. 2. Резистомы образцов фекалий, классифицированные по семействам ARG. По оси ординат указано число ARG, идентифицированных в метагеноме, на 10^9 нуклеотидов суммарной длины собранных контигов. Справа указаны следующие кластеры генов (сверху вниз): стрептограмин-ацетилтрансфераза; β -лактамаза класса A; обеспечивающий устойчивость к тетрациклину белок защиты рибосом; металло- β -лактамаза; линкозамид-нуклеотидилтрансфераза; хлорамфеникол-ацетилтрансфераза; кластер генов устойчивости к гликопептидам; белки защиты рибосомы ABC-F типа; аминогликозид-фосфотрансфераза.

циклину, не обнаружены в микробиоме ЖКТ яков, редко встречались у галловейского КРС ($0.27\text{--}0.91$ ARG/ 10^9 нуклеотидов), но были во множестве представлены у “стойлового” КРС ($0.79\text{--}5.69$ ARG/ 10^9 нуклеотидов).

Геномы микроорганизмов — представителей микробиоты ЖКТ животных

Кластеризация контигов в MAG позволила собрать 708 геномов с полнотой более 80% и избыточностью (загрязнением) менее 10%, в том числе 695 MAG бактерий и 13 — архей. По результатам анализа, 147 MAG содержали хотя бы один ARG, а один MAG, собранный из метагенома фекалий “стойлового” КРС (KA0045), содержал гены *aph(3')*, *ermF*, *tetX2*, *aadS*, которые могут придавать устойчивость к аминогликозидам, тетрациклину и макролидам. Таксономическая классификация генома этого потенциально мультирезистентного штамма в соответствии с Genome Taxonomy Database (GTDB) показала, что он относится к бактерии *Treponema bryantii* (филум Spirochaetota).

Количественный анализ содержания генов устойчивости к антибиотикам

Приведенные выше результаты дают информацию о наличии различных генов устойчивости в микробиомах ЖКТ животных, но не их количественной представленности, которая

зависит от относительной численности соответствующих бактерий-хозяев в микробиоте. Кроме того, выделенная из образцов фекалий метагеномная ДНК может помимо ДНК микробиоты ЖКТ содержать ДНК животного-хозяина, кормовых растений и других, доля которых в разных образцах может отличаться. В связи с этим содержание ARG нормировали на содержание генов 16S рРНК в метагеноме фекалий. Для количественной оценки представленности конкретных ARG в микробиоме ЖКТ делили число чтений, соответствующих этому ARG, на число чтений, относящихся к генам 16S рРНК прокариот в анализируемом метагеноме (табл. S1, см. Дополнительные материалы в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Begmatov_rus.pdf).

Результаты анализа показали, что содержание резистома в расчете на 16S рРНК в среднем составляло 0.22% у яков, 0.54% у галловейского КРС и было во много раз выше (3.41%) у “стойлового” КРС, причем отличия между всеми группами животных были статистически значимыми ($p < 0.01$). Процентное содержание и состав резистома у галловейского КРС и яков были в целом схожи, но резко отличались от этих показателей у “стойлового” КРС (рис. 3), поэтому в дальнейшем сравнивали две группы животных: “пастбищных”, находящихся на свободном выпасе (галловейский КРС и яки), и “стойловых”.

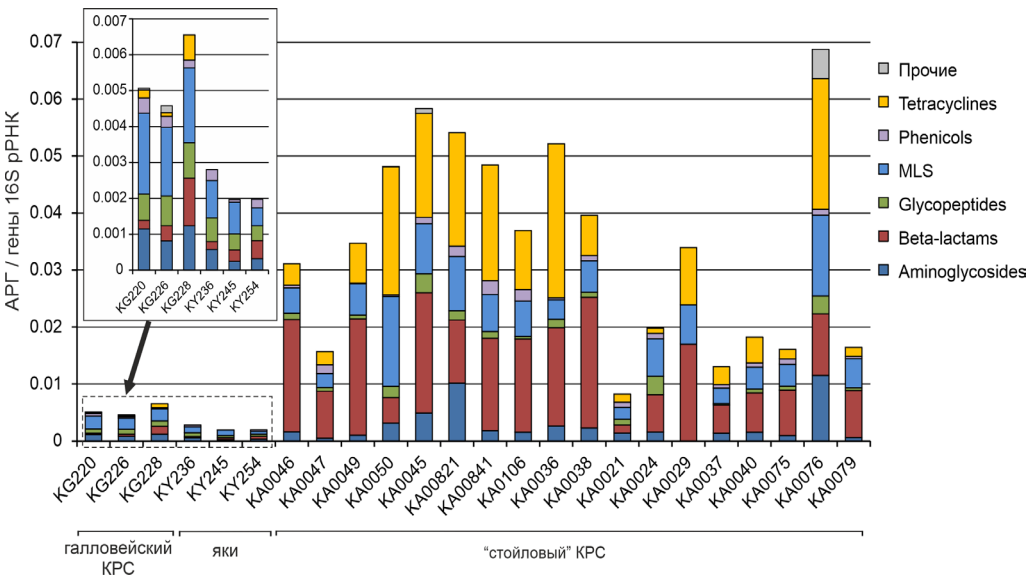


Рис. 3. Относительное содержание АРГ в микробиоме кишечника галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС представлено по классам антибиотиков. По оси ординат указано содержание АРГ в метагеноме фекалий, нормированное на содержание генов 16S рРНК. В левой части рисунка приведены данные для галловейского КРС и яков в увеличенном масштабе. Справа указаны следующие классы антибиотиков (сверху вниз): тетрациклины, фениколы, МЛС-группа, гликопептиды, β-лактамы, аминогликозиды.

Абсолютное большинство обнаруженных АРГ может обеспечивать устойчивость к антибиотикам шести классов: аминогликозиды, β-лактамы, гликопептиды, МЛС-антибиотики, фениколы и тетрациклины. Гены устойчивости к антибиотикам других классов составляли менее 2% резистомов. Хотя содержание АРГ всех шести классов было выше в метагеномах “стойловых” животных по сравне-

нию с “пастбищными”, по степени различий они четко разделялись на две группы (табл. 2). Гены β-лактамаз класса А, в основном *bla* и *cfxA*, были наиболее многочисленным классом АРГ у “стойловых” животных, а их содержание в микробиоме ЖКТ “пастбищных” было ниже в среднем в 24 раза. Еще большие различия выявлены для генов устойчивости к тетрациклину (*tetW*, *tetQ*, *tet(40)*,

Таблица 2. Представленность АРГ к различным классам антибиотиков в микробиомах ЖКТ животных “пастбищной” и “стойловой” групп

АРГ по классу антибиотика	Содержание АРГ, нормированное на содержание генов 16S рРНК		Средняя доля в резистоме (%)	
	“пастбищные”	“стойловые”	“пастбищные”	“стойловые”
β-лактамы	0.00050	0.01231	13.1	36.1
<i>bla</i>	0.00029	0.00725	7.6	21.2
<i>cfxA</i>	0.00018	0.00412	4.7	12.1
Тетрациклины	0.00017	0.01026	4.4	30.1
<i>tet(W)</i>	0.00013	0.00409	3.4	12.0
<i>tet(Q)</i>	0	0.00350	0	10.3
МЛС-группа	0.00145	0.00630	37.9	18.4
Аминогликозиды	0.00073	0.00270	19.1	7.9
Гликопептиды	0.00068	0.00126	17.8	3.8
Фениколы	0.00026	0.00092	6.8	2.7
Прочие	0.00004	0.00034	1.0	1.0
Всего	0.00382	0.03410	100	100

tetO и *tet(32)*), которые были вторым по представленности классом АРГ у “стойловых” животных. В группе “пастбищных” их средняя доля была ниже в 60 раз, причем у яков они не обнаружены вообще. Рассматривая конкретные гены в качестве маркеров “стойловых” животных, мы выделили следующие: *tetW*, *tetQ*, *bla* и *cfxA*, — на которые приходилось около половины их резистоста.

Намного меньшие отличия (в 2–4 раза) между “пастбищными” и “стойловыми” животными обнаружены для генов устойчивости к гликопептидным антибиотикам (*van*), МЛС (*abc-f*, *lnuC*, *mefA*, *vat*) и аминогликозидам (*aph(3)*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *ant(6)*), составлявшим большую часть резистоста “пастбищных” животных, а также АРГ к хлорамфениколу (*catA*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы охарактеризовали состав микробных сообществ и резистом ЖКТ галловейского КРС, яков и “стойлового” КРС из разных регионов России и Казахстана. Ранее проведенные исследования показали, что Firmicutes и Bacteroidota — доминирующие филумы бактерий в рубце КРС, причем относительная численность Firmicutes обычно больше у животных, получающих преимущественно травянистые корма, тогда как доля Bacteroidota возрастает при использовании крахмалсодержащих комбикормов [25, 26]. Большая доля Firmicutes и меньшая доля Bacteroidota у галловейского КРС по сравнению со “стойловым”, вероятно, связана с типом их рациона. Большую часть рациона пастбищных животных составляют дикорастущие растения как в летний, так и в зимний период. И яки, и галловейский КРС круглогодично пасутся на естественных, часто высокогорных лугах. Галловейский КРС в зимний период получает подкормку сеном, полученным из растений с местных лугов. В отличие от пастбищных животных, “стойловые” получали подкормку дробленным зерном (ячмень) и минералами. Метаногенные археи составляли заметную часть микробиоты ЖКТ у галловейского КРС и яков, что, по-видимому, связано с богатым целлюлозой рационом. М. Ророва с соавт. [27] показали, что коровы, получавшие корм на основе клетчатки, имели большее α -разнообразие метаногенов, чем те, рацион которых был богат крахмалом. Богатый травами рацион представлен и более широким спектром субстратов для метаногенов, что приводит к их большей численности и разнообразию [28].

Метагеномный анализ позволяет не только выявить набор генов, имеющихся в микробиоте, но и собрать геномы микроорганизмов-членов сообщества. Одной из целей работы было выяв-

ление штаммов с множественной антибиотикорезистентностью. Хотя большинство контигов, содержащих АРГ, имели короткую длину и не были отнесены к определенному MAG, один ген, представляющий *Treponema bryantii*, содержал гены устойчивости к аминогликозидам, тетрациклам и макролидам. Из работы С. Zhao и др. [29] известно, что относительная численность бактерий рода *Treponema* коррелирует с содержанием *tetX* и других генов устойчивости к тетрациклам (*tetC*, *tetG*, *tetO* и *tetT*). В исследованных нами образцах средняя доля *Treponema* в микробиомах “стойловых” животных была в несколько раз выше, чем у галловейского КРС и яков (1.40, 0.30 и 0.23% соответственно), как и представленность генов устойчивости к тетрациклам. Ранее сообщалось, что в хозяйстве, интенсивно применявшем противомикробные препараты, образцы фекалий КРС были обогащены представителями рода *Treponema* [30].

По относительному содержанию АРГ, т.е. доле резистоста в полном метагеноме, исследованные животные четко разделяются на две группы в соответствии с условиями содержания, а не видовой принадлежностью: “пастбищные” (галловейская порода КРС и яки) и “стойловые”. Во всех образцах второй группы доля резистоста в метагеноме (нормированная на содержание генов 16S рРНК) выше, чем у любого из пастбищных животных, а в среднем этот показатель отличался примерно на порядок. Вероятная причина этого — присутствие антибиотиков в составе кормовых добавок, применяемых на фермах. Интересно отметить, что содержание АРГ в группе “стойловых” животных сильно отличалось (рис. 3). Максимальное содержание АРГ обнаружено у молодых животных, чей возраст не превышал одного года (КА0050 и КА0076). Количество АРГ было высоким у телят (возраст до одного года), как разводимых в частных хозяйствах, так и на фермах с более высоким поголовьем в коровниках. По всей видимости, телята получают большую дозу антибиотиков через пищу — в связи со специальным прикормом молоком и комбикормом.

Несмотря на большие различия в общем содержании АРГ, гены устойчивости ко всем основным классам антибиотиков обнаружены как у “пастбищных”, так и у “стойловых” животных (за исключением устойчивости к тетрациклам у яков). Поскольку антибиотики и резистентность к ним встречаются в природе, резистом у “пастбищных” животных, по-видимому, отражает естественный фоновый уровень антибиотикорезистентности микробиоты ЖКТ у КРС.

По сравнению с “пастбищными” животными у “стойловой” группы содержание АРГ к МЛС-антибиотикам, аминогликозидам, гликопептидам и фениколам оказалось выше в 2–4

раза, а к β -лактамам и тетрациклинам — в 24 и 60 раз соответственно. При этом гены устойчивости к β -лактамам и тетрациклинам доминировали в резистоме “стойловой” группы, в то время как в “пастбищной” преобладала устойчивость к МЛС-антибиотикам, аминогликозидам и гликопептидам. По-видимому, АРГ к этим классам антибиотиков представляют естественный фоновый резистом, а широкое распространение устойчивости к β -лактамам и тетрациклинам в “стойловой” группе отражает активное использование этих антибиотиков в животноводстве. Известно, что бактерии “приобретают” АРГ в основном путем горизонтального переноса. Однако известна и внутренняя резистентность (intrinsic resistance) бактерий к противомикробным препаратам. P. Sornplang с соавт. [31] проанализировали чувствительность 93 штаммов *Lactobacillus*, выделенных из фекалий людей и сельскохозяйственных животных, к 7 антибиотикам, а именно: к пенициллину G, амксициллину-клавулановой кислоте, ванкомицину, тетрациклину, стрептомицину, цiproфлоксацину и сульфаметоксазол-триметоприму. Более 50% штаммов *Lactobacillus* обладали внутренней устойчивостью к ванкомицину, стрептомицину, цiproфлоксацину и сульфаметоксазол-триметоприму. Известно, что для многих энтерококков, например *Enterococcus gallinarum* и *E. casseliflavus/flavescens*, устойчивость к ванкомицину является внутренней резистентностью [32, 33]. Обнаруженные нами в микробиомах пастбищных животных гены *vanT*, *vanR*, *vanG* также, вероятно, определяют внутреннюю устойчивость к ванкомицину.

Недавно W. Wang и др. [9] представили результаты метагеномного анализа образцов фекалий яков, овец, свиней и лошадей, которых содержали в условиях свободного выпаса и в условиях интенсивного выращивания (>10000 голов). Ими показано, что у второй группы животных более разнообразный репертуар АРГ и повышена частота встречаемости резистентных штаммов, причем эти показатели коррелировали. Кроме того, в микробиомах животных в условиях интенсивного выращивания АРГ с большей частотой были ассоциированы с мобильными элементами, а также наблюдалось увеличение численности штаммов с МЛУ [9].

Таким образом, относительно малые доли резистомы в микробиомах фекалий исследованных нами коров и яков, находящихся на свободном выпасе, отражают отсутствие селективного давления, связанного с применением антибактериальных препаратов в составе кормов.

База данных NCBI Reference Gene Catalog содержит 54 семейства генов устойчивости к тетрациклинам (*ter**) и 14 семейств генов *bla* (β -лактамазы класса А и металло- β -лактамазы). Тетрациклины — это антибиотики широкого спектра действия, используемые для профилактики или лечения раз-

личных бактериальных инфекций человека и животных. На молочных предприятиях США для борьбы с бактериальными заболеваниями молочного скота в первую очередь используют β -лактамы и тетрациклиновые антибиотики. Антибиотики, устойчивые к ним бактерии и АРГ обнаруживают в фекалиях КРС, что может способствовать распространению антибиотикорезистентности. Хотя β -лактамы редко находят в навозе КРС, тетрациклины, более устойчивые к деградации в ЖКТ, встречаются часто. Мировая практика использования тетрациклиновых антибиотиков в животноводстве очень широкая. Например, на свиноводческих предприятиях тетрациклины применяют широко и большинство детектируемых АРГ в свином навозе относится именно к *tet*-генам [34–36]. Вторыми и третьими по численности были гены устойчивости к сульфаниламидам, которые также используют в кормовых добавках, и бета-лактамам. Показано, что в формировании резистомы микробиоты ЖКТ сельскохозяйственных животных во многих странах основная роль принадлежит АРГ, придающим устойчивость к тетрациклинам и β -лактамам [37–40].

Полученные нами данные о высокой, по сравнению с “пастбищными” животными, представленности генов устойчивости к тетрациклинам и β -лактамам в микробиомах фекалий “стойловых” коров из фермерских хозяйств России — свидетельство активного использования этих противомикробных препаратов в отечественном животноводстве. Однако информация о применении антибиотиков в конкретных животноводческих хозяйствах практически недоступна. Метагеномный анализ фекалий сельскохозяйственных животных может быть использован для количественного определения генов антибиотикорезистентности для мониторинга применяемых при содержании животных антибиотиков. Более простым вариантом тестирования может быть количественное определение методом ПЦР генов *tetW*, *tetQ*, *bla* и *cfxA*, содержание которых резко отличается у животных отгонно-пастбищного выпаса и стойлового содержания.

Мы признательны Мирону Чунову за предоставление возможности отбора проб фекалий яков и Николаю Нечипоренко за помощь с отбором проб фекалий галловейской породы крупного рогатого скота.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferri M., Ranucci E., Romagnoli P., Giaccone V. (2017) Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**(13), 2857–2876.
2. Poirel L., Madec J.Y., Lupo A., Schink A.K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. (2018) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **6**(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
3. Shrestha P., Cooper B.S., Coast J., Oppong R., Do Thi Thuy N., Phodha T., Celhay O., Guerin P.J., Wertheim H., Lubell Y. (2018) Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **7**, 98.
4. Van Boeckel T.P., Glennon E.E., Chen D., Gilbert M., Robinson T.P., Grenfell B.T., Levin S.A., Bonhoeffer S., Laxminarayan R. (2017) Reducing antimicrobial use in food animals. *Science.* **357**, 1350–1352.
5. Mendelsohn E., Ross N., Zambrana-Torrel C., Van Boeckel T.P., Laxminarayan R., Daszak P. (2023) Global patterns and correlates in the emergence of antimicrobial resistance in humans. *Proc. Biol. Sci.* **290**, 20231085.
6. Xu Q., Qiao Q., Gao Y., Hou J., Hu M., Du Y., Zhao K., Li X. (2021) Gut microbiota and their role in health and metabolic disease of dairy cow. *Front. Nutr.* **8**, 701511.
7. Lim S.K., Kim D., Moon D.C., Cho Y., Rho M. (2020) Antibiotic resistomes discovered in the gut microbiomes of Korean swine and cattle. *Gigascience.* **9**, giaa043.
8. Zhu Z., Cao M., Wang W., Zhang L., Ma T., Liu G., Zhang Y., Shang Z., Chen X., Shi Y., Zhang J. (2020) Exploring the prevalence and distribution patterns of antibiotic resistance genes in bovine gut microbiota using a metagenomic approach. *Microb. Drug Resist.* **27**, 980–990.
9. Wang W., Wei X., Wu L., Shang X., Cheng F., Li B., Zhou X., Zhang J. (2023) The occurrence of antibiotic resistance genes in the microbiota of yak, beef and dairy cattle characterized by a metagenomic approach. *J. Antibiot. (Tokyo).* **74**, 508–518.
10. Begmatov S., Beletsky A.V., Gruzdev E.V., Mardanov A.V., Glukhova L.B., Karnachuk O.V., Ravin N.V. (2022) Distribution patterns of antibiotic resistance genes and their bacterial hosts in a manure lagoon of a large-scale swine finishing facility. *Microorganisms.* **10**(11), 2301.
11. Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. (2016) Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(3), fiw018.
12. Magoc T., Salzberg S. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* **27**, 2957–2963.
13. Edgar R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* **26**, 2460–2461.
14. Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* **4**, 2584.
15. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**(Database issue), D590–6.
16. Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **1**, 10–12.
17. Li D., Luo R., Liu C.M., Leung C.M., Ting H.F., Sadakane K., Yamashita H., Lam T.W. (2016) MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods.* **102**, 3–11.
18. Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. (2019) MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ.* **7**, e7359.
19. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **25**, 1043–1055.
20. Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. (2019) GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics.* **36**, 1925–1927.
21. Parks D.H., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Rinke C., Mussig A.J., Hugenholtz P. (2020) A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1079–1086.
22. Langmead B., Salzberg S. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* **9**, 357–359.
23. Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* **11**, 119.
24. Feldgarden M., Brover V., Gonzalez-Escalona N., Frye J.G., Haendiges J., Haft D.H., Hoffmann M., Pettengill J.B., Prasad A.B., Tillman G.E., Tyson G.H., Klimke W. (2021) AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci. Rep.* **11**, 12728.
25. Fernando S.C., Purvis H., Najar F., Sukharnikov L., Krehiel C., Nagaraja T., Roe B., DeSilva U. (2010) Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7482–7490.
26. McCann J.C., Luan S., Cardoso F.C., Derakhshani H., Khafipour E., Looor J.J. (2016) Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. *Front. Microbiol.* **7**, 701.

27. Popova M., Martin C., Eugène M., Mialon M.M., Doreau M., Morgavi D.P. (2011) Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **166–167**, 113–121.
28. Clemmons B.A., Voy B.H., Myer P.R. (2019) Altering the gut microbiome of cattle: considerations of host-microbiome interactions for persistent microbiome manipulation. *Microb. Ecol.* **77**, 523–536.
29. Zhao C., Liu X., Tan H., Bian Y., Khalid M., Sinkkonen A., Jumpponen A., Rahman S.U., Du B., Hui N. (2024) Urbanization influences the indoor transfer of airborne antibiotic resistance genes, which has a seasonally dependent pattern. *Environ. Int.* **185**, 108545.
30. Lee C., Zaheer R., Munns K., Holman D.B., Van Domselaar G., Zovoilis A., McAllister T.A. (2023) Effect of antimicrobial use in conventional versus natural cattle feedlots on the microbiome and resistome. *Microorganisms*. **11**, 2982.
31. Sornplang P., Sakulsawasdi P., Piyadeatsoontorn S., Surasorn B. (2016) Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from human and food-producing animal feces in Khon Kaen Province, Thailand. *Trop. Anim. Health Prod.* **48**, 1739–1745.
32. Monticelli J., Knezevich A., Luzzati R., Di Bella S. (2018) Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *J. Infect. Chemother.* **24**, 237–246.
33. Rubinstein E., Keynan Y. (2013) Vancomycin-resistant enterococci. *Crit. Care Clin.* **29**, 841–852.
34. Zhu Y.G., Johnson T.A., Su J.Q., Qiao M., Guo G.X., Stedtfeld R.D., Hashsham S.A., Tiedje J.M. (2013) Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 3435–3440.
35. Li L., Xiao Y., Olsen R.H., Wang C., Meng H., Shi L. (2022) Short- and long-read metagenomics insight into the genetic contexts and hosts of mobile antibiotic resistome in Chinese swine farms. *Sci. Total Environ.* **827**, 154352.
36. Zhang J., Lu T., Chai Y., Sui Q., Shen P., Wei Y. (2019) Which animal type contributes the most to the emission of antibiotic resistance genes in large-scale swine farms in China? *Sci. Total Environ.* **658**, 152–159.
37. Rabello R.F., Bonelli R.R., Penna B.A., Albuquerque J.P., Souza R.M., Cerqueira A.M.F. (2020) Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: an update overview. *Animals* (Basel). **10**, 552.
38. Collis R.M., Burgess S.A., Biggs P.J., Midwinter A.C., French N.P., Toombs-Ruane L., Cookson A.L. (2019) Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in dairy farm environments: a New Zealand perspective. *Foodborne Pathog. Dis.* **16**, 5–22.
39. Figueiredo R., Henriques A., Sereno R., Mendonça N., da Silva G.J. (2015) Antimicrobial resistance and extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella enterica* serotypes isolated from livestock and processed food in Portugal: an update. *Foodborne Pathog. Dis.* **12**, 110–117.
40. Van Boeckel T.P., Pires J., Silvester R., Zhao C., Song J., Criscuolo N.G., Gilbert M., Bonhoeffer S., Laxminarayan R. (2019) Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*. **365**, eaaw1944.

Antibiotic Resistance Genes in Cattle Gut Microbiota: Influence of Housing Conditions

Sh. A. Begmatov^{1, *}, A. V. Beletsky¹, A. L. Rakitin¹, A. P. Lukina²,
L. O. Sokolyanskaya², A. V. Rakitin², L. B. Glukhova², A. V. Mardanov¹,
O. V. Karnachuk², N. V. Ravin¹

¹*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

*e-mail: shabegmatov@gmail.com

Resistance to antimicrobial drugs is an urgent problem not only in public health, but also in animal husbandry. The widespread use of antimicrobials in feed additives is one of the main reasons for the rapid spread of antibiotic resistance in the microbiota of the gastrointestinal tract of farm animals. To characterize antibiotic resistance genes (resistome), we performed metagenomic analysis of feces of 24 cattle from different regions of Russia, including cows of different breeds and yaks. Animals differed in the type of housing: year-round on pastures or in barns of conventional farms, with consumption of feed additives. Although genes of resistance to aminoglycosides, β -lactams, glycopeptides, MLS antibiotics (macrolides, lincosamides and streptogramins), phenicols and tetracyclines were detected in samples from both groups of animals, the content of resistome in the fecal microbiome of stall-bred cattle was about 10 times higher than in animals kept on pastures. The resistome of stall cattle was dominated by β -lactamases and tetracycline resistance genes, whose content in the microbiome was 24 and 60 times higher, respectively, than in animals kept on pastures. Apparently, the spread of resistance to β -lactams and tetracyclines in stall cattle reflects the active use of these antibiotics in livestock production. Metagenomic analysis of livestock feces can be used to quantify antibiotic resistance genes for the purpose of monitoring antimicrobial drugs used in animal husbandry.

Keywords: cattle, animal husbandry, antibiotics, antibiotic resistance, metagenomics, microbiome, yaks, cows