

Северное оленеводство

УДК 636.294:579.62:579.8

doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.355rus

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА РУБЦА У МОЛОДЫХ И ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ *Rangifer tarandus* ИЗ АРКТИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ РОССИИ В ЛЕТНЕ-ОСЕННИЙ ПЕРИОД*Л.А. ИЛЬИНА¹, К.А. ЛАЙШЕВ², Е.А. ЫЫЛДЫРЫМ¹, В.А. ФИЛИППОВА¹,
Т.П. ДУНЯШЕВ¹, А.В. ДУБРОВИН¹, И.Н. НИКОНОВ¹, Н.И. НОВИКОВА¹,
Г.Ю. ЛАПТЕВ¹, А.А. ЮЖАКОВ², Т.М. РОМАНЕНКО³, Ю.П. ВЫЛКО³

Оленеводство — стратегически значимая отрасль животноводства в арктических регионах Российской Федерации. На сегодняшний день микробиоценоз рубца у северного оленя (в сравнении с другими жвачными) наименее изучен, хотя его анализ представляет значительный интерес в связи с оценкой адаптационно-физиологических и анатомических приспособлений организма, позволяющих использовать скудные питательные ресурсы тундры и лесотундры. В настоящей работе впервые выполнены молекулярно-генетические исследования микробиома рубца северных оленей ненецкой породы, обитающих на территории двух регионов Арктической зоны России. Цель работы заключалась в сравнительной оценке таксономического состава бактериального сообщества рубца молодых и взрослых особей *Rangifer tarandus* из разных мест обитания. Образцы содержимого рубца отбирали в летне-осенний период в 2017 году от трех молодых (возраст 1-2 года) и трех взрослых особей (3-6 лет) из каждой возрастной группы в Ямало-Ненецком автономном округе (АО) и Мурманской области. Состав бактериального сообщества рубца анализировали методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). У северных оленей из Ямало-Ненецкого АО разнообразие микроорганизмов в рубце было достоверно более высоким ($P < 0,05$) по сравнению с животными из Мурманской области. У молодняка оленей из Ямало-Ненецкого АО отмечены достоверно меньшие ($P < 0,05$) показатели биоразнообразия по сравнению со взрослыми особями, тогда как у животных из Мурманской области такая закономерность отсутствовала. Установлено, что до $83,50 \pm 5,07$ % флотипов относились к четырем бактериальным филумам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, менее представленными оказались *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria*. По сравнению с наиболее изученными представителями семейства *Bovidae* у исследованных нами северных оленей в микробиоме рубца выявлено существенно большее количество неидентифицированных бактерий, а также представителей *Eubacteriaceae* и *Clostridiaceae*, часть которых проявляет способность к детоксикации усниновой кислоты и других вторичных метаболитов, продуцируемых лишайниками. В течение онтогенеза у северных оленей наблюдались заметные изменения в соотношении количества флотипов и таксономических групп микробиоты рубца. Наибольшие возрастные изменения были выявлены в составе филума *Firmicutes*. В рубце у взрослых особей из обоих регионов общее содержание целлюлозолитических бактерий класса *Clostridia*, особенно представителей семейств *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, обладающих потенциальной способностью к гидролизу углеводов растительных кормов с образованием летучих жирных кислот, было достоверно выше по сравнению с молодыми ($P < 0,05$). Обратная закономерность наблюдалась в отношении бактерий с аналогичными свойствами из филума *Bacteroidetes*. Выявлено значительное количество условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, среди которых доминирующими были представители семейств *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, филума *Fusobacteria*. Прямой закономерности, характеризующей возрастные изменения содержания в рубце патогенных микроорганизмов, в том числе филума *Fusobacteria*, семейств *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, у исследованных особей не выявили. Вероятно, детектированные различия в представленности перечисленных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов были связаны с особенностями пастбищного рациона в различных регионах и эпизоотической ситуацией в стаде, что требует дополнительных исследований.

Ключевые слова: микроорганизмы рубца, *Rangifer tarandus*, северный олень, молекулярно-генетические методы, Арктика.

Северный олень (*Rangifer tarandus*) — уникальный вид, специфически приспособленный к жизни в условиях Севера, в связи с чем оленеводство служит стратегически важной отраслью животноводства в арктических

* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда для реализации научного проекта № 17-76-20026 «Микробиоценоз рубца *Rangifer tarandus* Арктических регионов России как фундаментальная основа получения перспективных биотехнологий для сельскохозяйственных животных».

регионах России, обеспечивающей население продовольствием. Рацион северных оленей имеет значительные сезонные различия. В летне-осенний период его основу составляют почти 300 видов растений, включая злаки, осоки, листья ив, карликовых берез. На долю лишайников приходится до 15 %. В зимне-весенний период она возрастает до 70 %, а остальные 30 % представляют остатки зеленых растений, мхи, различные примеси (1, 2).

Усвоение растительных кормов у северных оленей происходит, как и у других жвачных, благодаря ферментам, продуцируемым симбионтами рубца. Известно, что рубец северных оленей населен симбиотическими микроорганизмами: бактериями, грибами, археями, простейшими (3-5). Его микробное сообщество может отражать как региональные особенности кормового пастбищного рациона, так и общее физиологическое состояние животных. По современным оценкам, разнообразие микроорганизмов в рубце жвачных достигает нескольких тысяч видов, но детально изучены менее 100. Большинство из них строго анаэробные некультивируемые виды (6-9), поэтому наиболее информативными методами исследования микробного сообщества рубца служат молекулярно-генетические, направленные на изучение его структуры в целом, — NGS-секвенирование (next-generation sequencing) и T-RFLP-анализ (terminal restriction fragment length polymorphism). Они позволяют детектировать и определять содержание низкопредставленных микроорганизмов в сообществе рубца, что продемонстрировано в исследованиях на крупном рогатом скоте (КРС) (10, 11), овцах (12, 13), оленях (14), козах (15, 16).

На сегодняшний день микробиоценоз рубца северного оленя наименее изучен среди жвачных, хотя его анализ представляет значительный интерес в связи с оценкой адаптационно-физиологических и анатомических приспособлений организма к неблагоприятным условиям ареала и условиям питания этого вида. Опубликованы единичные работы по молекулярно-генетическому анализу микробиоценоза рубца северных оленей, обитающих на территории Норвегии (14, 17), а также микрофлоры рубца других представителей семейства *Cervidae* — пятнистых оленей (18, 19).

В настоящей работе мы впервые выполнили молекулярно-генетические исследования микробиома рубца северных оленей, обитающих на территории двух зон Арктической России, — Мурманской области и Ямало-Ненецкого автономного округа. Показаны значимые различия в составе бактериального сообщества рубца в зависимости от региона и возраста животных. Наибольшие возрастные изменения выявлены в составе филума *Firmicutes*. Прямой закономерности, характеризующей возрастные изменения содержания в рубце патогенных микроорганизмов, не обнаружено.

Цель работы заключалась в сравнительной оценке таксономического состава бактериального сообщества рубца молодых и взрослых особей *Rangifer tarandus* из разных мест обитания в летне-осенний период.

Методика. Объектом исследования были молодые (возраст 1-2 года) и взрослые особи (3-6 лет) северных оленей ненецкой породы. Образцы содержимого рубца отбирали в летне-осенний период в 2017 году от 3 животных из каждой возрастной группы в Ямало-Ненецком автономном округе (АО) (п.г.т. Харп, лесотундровая природно-климатическая зона) и Мурманской области (ст. Лопарская, тундровая природно-климатическая зона).

Состав бактериального сообщества рубца анализировали методом T-RFLP (20). Общую ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью эубактериальных праймеров

63F (3'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-5') с меткой на 5'-конце (флуорофор WellRed D4, «Beckman Coulter», США) и 1492R (3'-TACGGHTAC-CTTGTTACGACTT-5'). Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли в следующем режиме: 3 мин при 95 °С (1 цикл); 30 с при 95 °С, 40 с при 55 °С, 60 с при 72 °С (35 циклов); 5 мин при 72 °С. Конечную концентрацию тотальной ДНК в растворе определяли на флуориметре Qubit («Invitrogen, Inc.», США) с использованием наборов Qubit dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen, Inc.», США) согласно рекомендациям производителя.

Флуоресцентно меченные ампликоны гена 16S рРНК очищали по стандартной методике (21). Рестрикцию 30-50 нг ДНК проводили с использованием *NotI*, *HhaI* и *MspI*, следуя рекомендации изготовителя («Fermentas, Inc.», Литва), в течение 2 ч при 37 °С. Продукты рестрикции осаждали этанолом, затем добавляли 0,2 мкл маркера молекулярной массы Size Standard-600 («Beckman Coulter», США) и 10 мкл формамида Sample Loading Solution («Beckman Coulter», США). Анализ проводили с помощью SEQ 8000 («Beckman Coulter», США), погрешность прибора составляла не более 5 %. Размеры пиков и их площадь вычисляли в программе Fragment Analysis («Beckman Coulter», США), выделяли подтипы (филотипы) с принятой в исследовании погрешностью в 1 нуклеотид и рассчитывали их относительную долю в микробном сообществе. Принадлежность бактерий к определенной таксономической группе определяли с использованием базы данных (<http://mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php>).

Результаты обрабатывали методом дисперсионного анализа, используя пакет программ Microsoft Excel 2010. В таблицах представлены средние (*M*) и ошибки средних (\pm SEM). Достоверность различий между средними значениями исследуемых показателей оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Коэффициенты биоразнообразия Шеннона и Симпсона рассчитывали в программе Past (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Результаты. Данные об усредненном составе летнего пастбищного рациона северных оленей представлены в таблице 1.

1. Усредненный состав (%) летнего пастбищного рациона северного оленя (*Rangifer tarandus*) в двух зонах Арктической России

Компонент рациона	I	II
Лишайники <i>Cladonia</i>	10	5
Лишайники <i>Nephroma</i>	—	5
Ива северная <i>Salix borealis</i>	20	5
Ива полярная <i>Salix polaris</i>	—	15
Голубика <i>Vaccinium uliginosum</i>	—	10
Береза карликовая <i>Betula nana</i>	20	25
Береза обыкновенная <i>Betula pendula</i>	20	5
Смесь многолетних трав	30	30

Примечание. I — станция Лопарская, Мурманская область (лесотундра), 2 — Харп, Ямало-Ненецкий автономный округ (тундра). Прочерки означают, что компонент в рационе отсутствовал.

В первые годы жизни у северных оленей наблюдается наибольший падеж, что, вероятно, обусловлено скудностью рациона в условиях природно-климатических зон обитания (22, 23).

Использованные нами праймеры позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК с позициями от 63-й до 1492-й (нумерация указана для гена 16S рРНК *Esherichia coli*).

С помощью молекулярно-генетического метода T-RFLP в бактериальном сообществе рубца *Rangifer tarandus* было выявлено значительное количество филотипов, общее число которых составляло от $106,0 \pm 4,70$ до $163,0 \pm 7,20$ в зависимости от возраста и региона обитания животных (табл. 2). В течение онтогенеза этот показатель изменялся. Максимальное количество филотипов обнаружили в образцах, отобранных у молодых особей в Мурманской области ($P < 0,05$), тогда как у животных из Ямало-Ненецкого АО наблюдалась обратная закономерность ($P < 0,05$).

Показатели индекса биоразнообразия Шеннона и индекса домини-

рования Симпсона для северных оленей из Ямало-Ненецкого АО были достоверно более высокими ($P < 0,05$), то есть у них неоднородность бактериального сообщества рубца оказалась выше, чем у животных из Мурманской области. У молодняка оленей из Ямало-Ненецкого АО отмечали достоверно меньшие ($P < 0,05$) показатели биоразнообразия по сравнению со взрослыми особями, что свидетельствует о меньшем накоплении энтропии, большей степени организации и однородности состава бактериального сообщества. У *Rangifer tarandus* из Мурманской области показатели биоразнообразия в течение онтогенеза существенно не изменялись (см. табл. 2).

2. Показатели биоразнообразия бактериального сообщества рубца у молодых (возраст 1-2 года) и взрослых (3-6 лет) особей северного оленя (*Rangifer tarandus*) из Мурманской области (I) и Ямало-Ненецкого автономного округа (II) ($M \pm SEM$, 2017 год)

Показатель	I		II	
	молодые	взрослые	молодые	взрослые
Индекс биоразнообразия Шеннона	2,89±0,32	2,61±0,23	5,40±0,18*	7,12±0,25*
Индекс биоразнообразия Симпсона	0,74±0,03	0,74±0,02	0,88±0,03*	0,90±0,04*
Количество филотипов, ед.	150,0±5,40	106,0±4,70	109,5±4,15	163,0±7,20

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

* Региональные различия статистически значимы при $P < 0,05$.

3. Соотношение бактериальных таксонов в содержимом рубца у молодых (возраст 1-2 года) и взрослых (3-6 лет) особей северного оленя (*Rangifer tarandus*) из Мурманской области (I) и Ямало-Ненецкого автономного округа (II) ($M \pm SEM$, 2017 год)

Встречаемость, %	I		II	
	молодые	взрослые	молодые	взрослые
Фила <i>Bacteroidetes</i>	8,20±0,38	3,89±0,13*	18,32±0,84	13,45±0,64*
Фила <i>Firmicutes</i>	17,00±0,75	46,59±2,08*	35,93±1,63	48,65±1,96*
класс <i>Clostridia</i>	9,08±0,40	32,52±1,65*	15,12±0,65	26,86±1,21*
семейство <i>Thermoanaerobacteraceae</i>	2,42±0,11	1,11±0,04*	0,24±0,01	0,12±0,01
семейство <i>Lachnospiraceae</i>	0,52±0,03	6,83±0,31*	2,30±0,10	2,72±0,35
семейство <i>Eubacteriaceae</i>	1,30±0,05	16,90±0,74*	9,47±0,34	15,34±0,48*
семейство <i>Ruminococcaceae</i>	1,16±0,04	0,80±0,03*	0,19±0,01	—
семейство <i>Clostridiaceae</i>	3,68±0,17	5,16±0,19*	2,61±0,20	8,36±0,38*
род <i>Peptococcus</i>	—	1,72±0,07	0,31±0,02	0,32±0,01
род <i>Lactobacillus</i>	4,16±0,19	4,71±0,27	2,66±0,12	1,12±0,06*
род <i>Bacillus</i>	1,56±0,06	5,97±0,24*	4,37±0,25	5,03±0,22
род <i>Staphylococcus</i>	0,14±0,01	0,86±0,04*	0,10±0,01	0,31±0,02*
класс <i>Negativicutes</i>	2,06±0,08	2,53±0,14	13,68±0,54	15,33±0,63
Фила <i>Actinobacteria</i>	15,65±0,78	4,47±0,17*	12,20±0,52	7,91±0,30*
род <i>Bifidobacterium</i>	0,25±0,02	0,15±0,01*	1,09±0,06	0,21±0,02*
прочие	15,40±0,65	4,32±0,16*	11,11±0,36	7,70±0,21*
Фила <i>Proteobacteria</i>	7,63±0,29	13,11±0,63*	4,34±0,21	13,49±0,34*
семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	0,64±0,03	7,59±0,12*	1,83±0,09	1,00±0,04*
семейство <i>Campylobacteriaceae</i>	6,08±0,28	3,04±0,10*	1,30±0,05	9,69±0,35*
семейство <i>Pseudomonadaceae</i>	0,91±0,03	1,94±0,43*	0,32±0,05	0,48±0,02
семейство <i>Burkholderiaceae</i>	—	0,29±0,01	0,89±0,04	2,32±0,08*
семейство <i>Succinivibrionaceae</i>	—	0,25±0,01	—	—
Фила <i>Tenericutes</i> (род <i>Mycoplasma</i>)	0,82±0,02	1,48±0,04*	—	—
Фила <i>Fusobacteria</i>	1,05±0,04	0,97±0,06	0,18±0,01	1,65±0,05*
Фила <i>Cyanobacteria</i>	—	—	0,70±0,03	0,75±0,02
Фила <i>Acidobacteria</i>	—	—	0	0,33±0,01
Неклассифицированные последовательности	49,65±3,35	29,49±1,32*	28,33±1,12	13,77±0,95*

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика». Прочерки означают, что значения находились ниже достоверного определения методом T-RFLP.

* Различия между взрослыми и молодыми особями в пределах одного региона статистически значимы при $P < 0,05$.

По результатам оценки таксономической принадлежности большинство выявленных филотипов было отнесено к четырем бактериальным филумам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, суммарная доля которых в содержимом рубца северных оленей составляла в зави-

симости от возраста и региона обитания от $48,48 \pm 4,19$ до $83,50 \pm 5,07$ % (табл. 3). В меньшей степени в сообществе рубца оказались представлены бактерии филумов *Tenericutes* и *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*. Значительную часть филоотипов (от $13,77 \pm 0,95$ до $49,65 \pm 3,35$ %) не удалось идентифицировать и отнести к определенному таксону, что указывает на необходимость дополнительных исследований для установления их функционального значения в физиологических процессах.

Полученные результаты в целом соответствуют современным представлениям о микробиоте рубца как жвачных в целом (8, 20, 24), так и северных оленей (14, 17). Например, ранее сообщалось о большем количестве неидентифицированных таксонов в рубце у северных оленей *Rangifer tarandus tarandus*, обитающих в Норвегии по сравнению с крупным рогатым скотом и газелями Томпсона (5).

Процентное содержание представителей *Eubacteriaceae* и *Clostridiaceae* из класса *Clostridia*, обладающих целлюлозо- и сахаролитическими свойствами, у исследованных нами особей *Rangifer tarandus* также было значительно выше, чем сообщалось для наиболее изученных жвачных семейства *Bovidae*, в частности для КРС (8, 20, 24). По мнению исследователей, указанные анаэробные микроорганизмы, в частности *Eubacterium rangiferina*, у северных оленей обеспечивают процессы детоксикации усниновой кислоты и других вторичных метаболитов, продуцируемых лишайниками родов *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia*, *Alectoria* (25-27). Считается, что благодаря особенностям микробного сообщества рубца северных оленей потребление значительного количества лишайников в зимний период (до 70 % в общем составе рациона) не оказывает токсического действия на северных оленей (в отличие от лосей или овец). Так, сообщалось о массовом падеже более 300 лосей вследствие употребления лишайников при отсутствии альтернативного корма (25).

Упоминалось о присутствии в рубце северных оленей микроорганизмов из филума *Cyanobacteria* (17), что представляется вполне закономерным, поскольку цианобактерии относятся к симбионтам лишайников. Наиболее часто цианобионтами лишайников оказываются представители рода *Nostoc*, в меньшей степени — родов *Calothrix*, *Scytonema* и *Fischerella* (28). Количество цианобактерий у исследованных нами особей из Ямало-Ненецкого АО было минорным, тогда как у животных из Мурманской области оно оказалось ниже предела достоверного определения методом T-RFLP, что, вероятно, связано с региональными особенностями летнего пастбищного рациона северных оленей.

В возрастных изменениях структуры микробиома у северных оленей из различных регионов Арктики мы выявили ряд сходных тенденций. Так, общее процентное содержание неидентифицированных бактериальных филоотипов у взрослых особей было гораздо ниже ($P < 0,05$), чем у молодых. Наибольшие возрастные изменения среди идентифицированных таксонов отмечались для филума *Firmicutes*. В рубце у взрослых особей общее содержание микроорганизмов класса *Clostridia*, особенно представителей семейств *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae* и *Lachnospiraceae*, обладающих потенциальной способностью к гидролизу углеводов растительных кормов с образованием летучих жирных кислот, было достоверно выше по сравнению с молодыми ($P < 0,05$). Обратную закономерность отмечали в отношении бактерий с аналогичными свойствами из филума *Bacteroidetes* (в том числе родов *Bacteroides*, *Prevotella*), которые ферментируют крахмал, клетчатку, некоторые другие углеводы, белки и дезаминируют аминокислоты.

Интересно отметить практически полное отсутствие в рубце у ис-

следуемых особей целлюлозолитических бактерий семейства *Ruminococcaeae*, которых в значительном количестве выявляют в рубце у крупного рогатого скота (8, 20, 24).

Численность бактерий класса *Negativicutes*, способных утилизировать образующие в результате сбраживания моносахаров, олиго- и полисахаридов кислоты (включая уксусную, пропионовую, масляную, молочную и др.) у взрослых особей имело некоторую тенденцию к увеличению по сравнению с молодыми. Ранее присутствие в рубце значительного количества селеномонад (в том числе *Selenomonas ruminantium*), которые отличались по внешнему виду и разнообразию от встречающихся у КРС, описано Б.В. Таракановым (7). Сообщалось, что утилизирующие кислоты бактерии родов *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Dialister* — физиологически значимая группа для КРС, поскольку они не позволяют накапливаться в рубце лактату, повышение доли которого может приводить к снижению pH и инициировать развитие лактатного ацидоза (7, 20, 29). Следует отметить достоверно меньшую долю ($P < 0,05$) представителей кислотообразующих бактерий рода *Lactobacillus* и достоверно большую ($P < 0,05$) — утилизирующих кислоты видов класса *Negativicutes* у особей из Ямало-Ненецкого АО по сравнению с животными из Мурманской области. Выявленные различия, вероятно, связаны с региональными особенностями летнего пастбищного рациона северных оленей тундровой природно-климатической зоны в Мурманской области и лесотундровой — в Ямало-Ненецком АО.

В сообществе рубца были широко представлены условно-патогенные микроорганизмы, большинство из которых традиционно связывают с развитием гастроэнтеритов, — бактерии семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*. Высокой оказалась доля актиномицетов филума *Actinobacteria* (семейства *Coriobacteriaceae*, *Corynebacterium*), среди которых могут встречаться возбудители актиномикозов, характеризующихся поражением различных органов и тканей (20). Среди бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, были детектированы возбудители кампилобактериоза (семейство *Campylobacteraceae*), пастереллеза (семейство *Pasteurellaceae*), микоплазмоза (филум *Tenericutes*), некробактериоза (филум *Fusobacteria*), гнойно-некротических инфекций (род *Staphylococcus*). Содержание перечисленных патогенов у исследованных особей было минорным, за исключением энтеробактерий, актинобактерий, кампилобактерий и фузобактерий. В северном оленеводстве достаточно полно охарактеризованы только проблемы, связанные с развитием некробактериоза, поскольку он может стать причиной массовой гибели молодняка. Показано, что у КРС возбудитель некробактериоза *Fusobacterium necrophorum* способен проникать в кровь и инфицировать организм с развитием абсцессов печени, пораженных копыт, кожи, слизистых (22, 23, 29).

Прямой закономерности, характеризующей возрастные изменения содержания в рубце патогенных микроорганизмов, в том числе филума *Fusobacteria*, семейств *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, у исследованных особей северного оленя мы не выявили. Вероятно, детектированные различия в представленности перечисленных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов были связаны с особенностями пастбищного рациона и эпизоотической ситуацией в стаде, что требует уточнения в дополнительных исследованиях.

Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа методом T-RFLP свидетельствуют о заметных изменениях бактериального сообщества в рубце у северных оленей в течение онтогенеза и различиях в его составе у животных, обитающих на территории Мурманской области и Ямало-Ненецкого автономного округа. В целом более 80 % выявленных

микроорганизмов относилось к четырем бактериальным филумам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Менее представленными оказались *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria*. Общее биоразнообразие микроорганизмов было достоверно выше ($P < 0,05$) у особей из Ямало-Ненецкого АО по сравнению с животными из Мурманской области. Отмечены сходные тенденции в изменении состава бактерий, потенциально способных гидролизовать углеводы растительных кормов, при этом прямой закономерности, характеризующей возрастные изменения содержания в рубце патогенных микроорганизмов, не выявлено. Полученные данные позволяют углубить имеющиеся сведения о физиологии северного оленя, обитающего в условиях Арктической России. Эти результаты могут быть использованы в качестве основы для создания рекомендаций для повышения эффективности разведения северных оленей и снижения падежа животных.

¹ООО «БИОТРОФ+»,

192284 Россия, г. Санкт-Петербург, Загребский бульвар, д. 19, корп. 1,
e-mail: ilina@biotrof.ru ✉;

²ФГБУ Северо-Западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 7,
e-mail: layshev@mail.ru;

³ФГБНУ Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики РАН им. Н.П. Лаверова
РАН, Нарьян-Марская сельскохозяйственная станция,
166004 Россия, Ненецкий автономный округ, г. Нарьян-Мар,
ул. Рыбников, 1А,
e-mail: nmshos@atnet.ru

Поступила в редакцию
8 декабря 2017 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 2, pp. 355–363

COMPARATIVE ANALYSIS OF RUMEN BACTERIAL COMMUNITY OF YOUNG AND ADULT *Rangifer tarandus* REINDEERS FROM ARCTIC REGIONS OF RUSSIA IN THE SUMMER-AUTUMN PERIOD

L.A. Ilina¹, K.A. Laishev², E.A. Yildirim¹, V.A. Filippova¹, T.P. Duniyashev¹, A.V. Dubrowin¹, I.N. Nikonov¹, N.I. Novikova¹, G.Yu. Laptev¹, A.A. Yuzhakov², T.M. Romanenko³, Yu.P. Vylko³

¹JSC «Biotrof+», 19 corp. 1, Zagrebkii bulv., St. Petersburg, 192284 Russia, e-mail ilina@biotrof.ru (✉ corresponding author);

²Northwest Center for Interdisciplinary Research of Food Security Problems, Federal Agency of Scientific Organizations, 7, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg—Pushkin, 196608 Russia, e-mail layshev@mail.ru;

³Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research (FCIARctic) RAS, Naryan-Mar Agro-Experimental Station, Federal Agency of Scientific Organizations, 1a, ul. Rybnikov, Naryan-Mar, Nenets AO, 166004 Russia, e-mail nmshos@atnet.ru

ORCID:

Ilina L.A. orcid.org/0000-0003-2789-4844

Yildirim E.A. orcid.org/0000-0002-5846-5105

Duniyashev T.P. orcid.org/0000-0002-3918-0948

Novikova N.I. orcid.org/0000-0002-9647-4184

Yuzhakov A.A. orcid.org/0000-0002-0633-4074

Vylko Yu.P. orcid.org/0000-0002-6168-8262

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported by a grant from the Russian Science Foundation, the project No. 17-76-20026 for biotechnologies based on fundamental studies of rumen microbiocenosis of the *Rangifer tarandus* from the Russian Arctic

Received December 8, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2018.2.355eng

Abstract

Reindeer husbandry is a strategically important industry in the Arctic regions of Russian Federation due to providing the native population with food stuffs. Observing the characteristics of rumen microorganisms' composition is necessary to deepen the information on the reindeer physiology. In this paper, the results of molecular genetic analysis of the rumen bacterial community composition of young and adult specimen *Rangifer tarandus* individuals from Arctic regions of Russia are presented for the first time. Samples of ruminal contents were collected from 3 animals of each age

group in 2017 summer-autumn period in the Yamal-Nenets Autonomous District and the Murmansk Province. The bacterial community composition of the reindeer rumen was analyzed in the laboratory of the «BIOTROF+» company by T-RFLP method (terminal restriction fragment length polymorphism). According to the biodiversity indicators, the Yamal-Nenets Autonomous District reindeer ruminal microorganisms' diversity was significantly higher ($P < 0.05$) than that in the reindeers of Murmansk region. Young reindeers from the Yamalo-Nenets Autonomous District showed lower biodiversity indicators ($P < 0.05$) comparing to adults, whereas in the Murmansk region this was not observed. According to the taxonomic affiliation, it has been established that up to 83.50 ± 5.07 % of the phylotypes belong to four bacterial phyla, the *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*, while *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria* were less frequent. Ruminal microbiome of *Rangifer tarandus* reindeers showed much higher proportion of unidentified bacteria, as well as the *Eubacteriaceae* and *Clostridiaceae* bacteria, as compared to the most studied members of the *Bovidae* family. Note, that several *Eubacteriaceae* and *Clostridiaceae* members are capable of detoxification of usnic acid and other secondary metabolites produced by lichens. During the reindeer ontogenesis, noticeable changes in the ratio of phylotypes and taxonomic groups in rumen microbiota were found. The greatest age changes were noticed in the phylum *Firmicutes* composition. In adult reindeer rumen, the total counts of cellulolytic bacteria of the *Clostridia* class, especially of the families *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae* and *Lachnospiraceae* potentially capable of hydrolysis of plant carbohydrates with the formation of volatile fatty acids (VFA), were significantly higher than in young group ($P < 0.05$). The inverse pattern was characteristic of bacteria with similar properties from the phylum *Bacteroidetes*, including the genera *Bacteroides*, *Prevotella*. Identification of a significant number of opportunistic and pathogenic microorganisms in the *Rangifer tarandus* rumen bacterial community, with the dominance of the phylum *Fusobacteria*, families *Campylobacteriaceae* and *Enterobacteriaceae*, is also of interest. Up to date, this issue has been poorly observed. Direct regularity in changing ruminal pathogen profiles in reindeers of different age or from different habitat was not revealed. Perhaps the detected differences in the level of pathogenic and opportunistic microorganisms could be associated with other factors, e.g. specific pasture ration in different regions or the epizootic situation in the herd. Additional research will clarify the issues in question. In general, the obtained results can be used as a basis to develop recommendations for improving the efficiency of animals breeding.

Keywords: rumen microorganisms, molecular-genetic methods, reindeer, *Rangifer tarandus*, Arctic regions.

REFERENCES

- Orpin C.G., Mathiesen S.D., Greenwood Y., Blix A.S. Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Appl. Environ. Microb.*, 1985, 50(1): 144-151.
- Sundset M.A., Edwards J.E., Cheng Y.F., Senosiain R.S., Fraile M.N., Northwood K.S., Præsteng K.E., Glad T., Mathiesen S.D., Wright A.D.G. Molecular diversity of the rumen microbiome of *Norwegian reindeer* on natural summer pasture. *Microb. Ecol.*, 2009, 57: 335-348 (doi: 10.1007/s00248-008-9414-7).
- Mathiesen S.D., Mackie R.I., Aschfalk A., Ringø E., Sundset M.A. Microbial ecology of the gastrointestinal tract in reindeer — changes through season. In: *Microbial ecology of the growing animal; Biology of the growing animals. V. 3*. W. Holzapfel, P. Naughton (eds.). Elsevier Press, Oxford: 73-100.
- Sundset M.A., Edwards J.E., Cheng Y.F., Senosiain R.S., Fraile M.N., Northwood K.S., Præsteng K.E., Glad T., Mathiesen S.D., Wright A.D. Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2009, 70(3): 553-562 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00750.x).
- Sundset M.A., Præsteng K.E., Cann I.K.O., Mathiesen S.D., Mackie R.I. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. *Microb. Ecol.*, 2007, 54: 424-438 (doi: 10.1007/s00248-007-9254-x).
- Orpin C.G., Joblin K.N. The rumen anaerobic fungi. In: *The rumen microbial ecosystem*. P.N. Hobson, C.S. Stewart (eds.). Blackie Academic & Professional, London, 1997: 140-195.
- Tarakanov B.V. *Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* [Methods for studying microflora of the digestive tract of agricultural animals and poultry]. Moscow, 2006 (in Russ.).
- Church D.C. *Ruminant animal: Digestive physiology and nutrition*. Prentice Hall, New Jersey, 1993.
- Hungate R.E. *The rumen and its microbes*. Academic Press, NY, 1966.
- Jami E., Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33306 (doi: 10.1371/journal.pone.0033306).
- Veneman J.B., Muetzel S., Hart K.J., Faulkner C.L., Moorby J.M., Perdok H.B. Does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in

- dairy cows? *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0140282 (doi: 10.1371/journal.pone.0140282).
12. Snelling T.J., Genç B., McKain N., Watson M., Waters S.M., Creevey C.J., Wallace R.J. Diversity and community composition of methanogenic archaea in the rumen of Scottish upland sheep assessed by different methods. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106491 (doi: 10.1371/journal.pone.0106491).
 13. de la Fuente G., Belanche A., Girwood S.E., Pinloche E., Wilkinson T., Newbold C.J. Pros and cons of Ion-Torrent next generation sequencing versus Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community. *PLoS ONE*, 2014, 9(7): e101435 (doi: 10.1371/journal.pone.0101435).
 14. Salgado-Flores A., Hagen L.H., Ishaq S.L., Zamanzadeh M., Wright A.-D.G., Pope P.B. Rumen and cecum microbiomes in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are changed in response to a lichen diet and may affect enteric methane emissions. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0155213. (doi: 10.1371/journal.pone.0155213).
 15. Han X., Yang Y., Yan H., Wang X., Qu L., Chen Y. Rumen bacterial diversity of 80 to 110-day-old goats using 16S rRNA sequencing. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0117811 (doi: 10.1371/journal.pone.0117811).
 16. Wang L., Xu Q., Kong F., Yang Y., Wu D., Mishra S., Li Y. Exploring the goat rumen microbiome from seven days to two years. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0154354 (doi: 10.1371/journal.pone.0154354).
 17. Zielińska S., Kidawa D., Stempniewicz L., Łoś M., Łoś J.M. New insights into the microbiota of the Svalbard Reindeer *Rangifer tarandus platyrhynchus*. *Front. Microbiol.*, 2016, 7: 170 (doi: 10.3389/fmicb.2016.00170).
 18. Gruninger R.J., Sensen C.W., McAllister T.A., Forster R.J. Diversity of rumen bacteria in Canadian cervids. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e89682 (doi: 10.1371/journal.pone.0089682).
 19. Zhi-Peng L., Na J., Han-Lu L., Xue-Zhe C., Yi J., Fu-He Y., Guang-Yu L. Analysis of bacterial diversity in rumen of sika deer (*Cervus nippon*) fed different forages using DGGE and T-RFLP. *China Agriculture Science*, 2014, 47(4): 759-768 (doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2014.04.016).
 20. Laptsev G.YU., Novikova N.I., Il'ina L.A., Ilydyrym E.A., Nagornova K.V., Dumova V.A., Soldatova V.V., Bol'shakov V.N., Gorfunkel' E.P., Dubrovina E.G., Sokolova O.N., Nikonov I.N., Lebedev A.A. *Normy soderzhaniya mikroflory v rubtse krupnogo rogatogo skota* Norms of microflora in rumen of cattle]. St. Petersburg, 2016 (in Russ.).
 21. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, 1982.
 22. Samandas A.M., Laishev K.A., Samoilov S.G. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki*, 2011, 5-6: 92-96 (in Russ.).
 23. Laishev K.A., Samandas A.M., Mityukov A.S., Prokudin A.V., Silkina E.V. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2011, 24: 118-121 (in Russ.).
 24. Nelson K.E., Zinder S.H., Hance I., Burr P., Odongo D., Wasawo D., Odenyo A., Bishop R. Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. *Environ. Microbiol.*, 2003, 5: 1212-1220 (doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00526.x).
 25. Roach J.A.G., Musser S.M., Morehouse K., Woo J.Y.J. Determination of usnic acid in lichen toxic to elk by liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometry determination. *J. Agr. Food Chem.*, 2006, 54: 2484-2490 (doi: 10.1021/jf052767m).
 26. Luzina O.A., Salakhutdinov N.F. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2016, 3(42), 2016: 276 (doi: 10.7868/S0132342316030106) (in Russ.).
 27. Sundset M.A., Kohn A., Mathiesen S.D., Præsteng K.E. *Eubacterium rangiferina*, a novel usnic acid-resistant bacterium from the reindeer rumen. 2008. *Naturwissenschaften*, 95: 741-749 (doi: 10.1007/s00114-008-0381-0).
 28. Pankratov T.A., Kachalkin A.V., Korchikov E.S., Dobrovol'skaya T.G. *Mikrobiologiya*, 2017, 3(86): 265-283 (doi: 10.7868/S0026365617030156) (in Russ.).
 29. Nocek J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80: 1005-1028 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0).

Science events

MACROPINOCYTOSIS IN PHYSIOLOGY, DISEASE AND THERAPY

(May 21-22, 2018, Chicheley, United Kingdom)

The engulfment of extracellular solutes or particles by macropinocytosis is an important process with newly appreciated significance for fundamental cell biology, cancer, infectious diseases and therapeutics. This first-of-its-kind meeting devoted to macropinocytosis will bring together experts from disparate fields with a shared interest in the biology of macropinosome formation and trafficking, with the goal of fostering collaboration and building a community. Subdisciplines: biology, microbiology, molecular biology, genetics, immunology, physiology, life science.

Information: <https://royalsociety.org/science-events-and-lectures/2018/05/macropinocytosis/>