

МЕСТО ОБИТАНИЯ КАК ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ФАКТОР ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБИОМА РУБЦА У СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ В АРКТИЧЕСКОЙ РОССИИ*

Л.А. ИЛЬИНА¹, К.А. ЛАЙШЕВ², Е.А. ЙЫЛДЫРЫМ¹, В.А. ФИЛИППОВА¹,
Т.П. ДУНЯШЕВ¹, А.В. ДУБРОВИН¹, Д.В. СОБОЛЕВ¹, Н.И. НОВИКОВА¹,
Г.Ю. ЛАПТЕВ¹, А.А. ЮЖАКОВ², Т.М. РОМАНЕНКО³, Ю.П. ВЫЛКО³

Северный олень (*Rangifer tarandus*) географически изолирован от других подвидов жвачных семейства *Cervidae*, что предполагает формирование специфических микробных сообществ рубца у этого вида. Известно, что приуроченность к определенным экологическим условиям может оказывать значимое влияние на состав микробиоты рубца жвачных. В настоящей работе с применением молекулярно-биологического анализа впервые показано, что одним из ключевых факторов, влияющих на состав микробиома рубца у северного оленя, служит место обитания. Цель работы состояла в оценке региональных и половозрастных особенностей микробиома рубца северных оленей из различных природно-климатических зон Российской Федерации с использованием T-RFLP-анализа (terminal restriction fragment length polymorphism) и количественной ПЦР. Объектом исследования были 58 особей северных оленей ненецкой породы — телята (4–8 мес) и взрослые особи. Содержимое рубца северных оленей отбирали в летне-осенний период 2017 года ($n \geq 3$ из каждой возрастной группы) в Ямало-Ненецком автономном округе (АО) (п.г.т. Харп, лесотундровая природно-климатическая зона), Ненецком АО (п. Нельмин-Нос, тундровая природно-климатическая зона) и Мурманской области (ст. Лопарская, тундровая природно-климатическая зона). Также для анализа были отобраны образцы пастбищной растительности, составлявшие основу рациона северных оленей в каждом регионе. Общее количество бактерий, архей и грибов класса *Neocallimastigales* в содержимом рубца анализировали методом количественной ПЦР, состав бактериального сообщества — методом T-RFLP. Основным детерминантом всех компонент микробного сообщества рубца северных оленей оказались региональные условия обитания, что, по всей видимости, обусловлено различиями в составе пастбищного рациона и эпизоотической ситуацией в стаде. Наименьшее сходство с другими регионами по составу содержимого рубца было выявлено у образцов из Мурманской области. Половозрастные различия животных оказались менее значимыми, однако вносили определенный вклад в соотношение микроорганизмов в рубце. Выявленные изменения микробиоты были неодинаковы у особей из разных регионов. Так, у северных оленей старше 2 лет из Мурманской области и Ямало-Ненецкого АО наблюдалось достоверное увеличение численности бактерий ($p < 0,05$), в отличие от особей из Ненецкого АО. Вне зависимости от региона отбора образцов доминирующими в содержимом рубца были представители филума *Firmicutes*, в меньшей степени детектированы бактерии филумов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, доля других выявленных таксонов (*Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*) в сообществе была минорной. В целом, отмечены значимые изменения представленности ряда таксонов в связи с показателями питательности пастбищного рациона северных оленей. Помимо рубцовых микроорганизмов, традиционно связанных с деградацией целлюлозы, статистически значимую связь установили между содержанием клетчатки в пастбищных кормах и численностью членов семейств *Veillonellaceae* ($r = -0,75$), *Nostocaceae* ($r = 0,52$), *Rivulariaceae* ($r = -0,88$). Значимой взаимосвязи количества условно-патогенных микроорганизмов из филумов *Fusobacteria*, *Tenericutes* (семейство *Mycoplasmataceae*) и *Proteobacteria* (семейства *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteraceae*) с показателями питательности кормов и представленностью других групп микроорганизмов мы не отмечаем. Для углубленного изучения выявленных закономерностей, их причин и механизмов требуются дополнительные исследования.

Ключевые слова: T-RFLP-анализ, количественная ПЦР, микробиом рубца, северный олень, *Rangifer tarandus*, Российская Арктика.

Северный олень (*Rangifer tarandus*) занимает особое место среди растительноядных жвачных. Географическая изоляция этого вида от других подвидов семейства *Cervidae* (1) предполагает не только анатомические и морфологические особенности в строении пищеварительной системы, но

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

и формирование специфических микробных сообществ рубца (2-4). Интерес к исследованию сложных симбиотических сообществ рубца северных оленей также связан с изучением адаптационных приспособлений организма этих животных к неблагоприятным факторам, в частности возможности эффективно использовать скудные растительные ресурсы пространств тундры, лесотундры и северной тайги (5). На формирование микробных сообществ в рубце жвачных животных влияет комплекс взаимообусловленных факторов: разнообразие источников растительной клетчатки, взаимодействия между микроорганизмами различных групп, таксономическое разнообразие ферментных систем, молекулярное строение ферментов, физиология микроорганизмов, экологические аспекты (6-8). В связи с этим адаптационные приспособления северных оленей должны рассматриваться с учетом условий их местообитания, доступности питательных ресурсов и других факторов (9).

Приуроченность к определенным экологическим условиям оказывает влияние на состав микробиоты рубца у представителей жвачных (10). Однако такие исследования сосредоточены преимущественно на анализе представленности отдельных групп микроорганизмов, например целлюлозолитических. Так, существенное различие микробных сообществ рубца показано для двух географически отделенных подвидов северных оленей Норвегии — *Rangifer tarandus* (*Eurasian tundra reindeer*, *R. tarandus tarandus*) материковой части страны и *R. tarandus platyrhynchus* (*Svalbard reindeer*, *R. tarandus platyrhynchus*) высокоарктического архипелага Шпицберген, расположенного между Норвегией и Северным Полюсом. При этом у *R. tarandus platyrhynchus*, которые в течение 8-10-месячного зимнего периода вынуждены питаться кормом с высоким содержанием лигнина, отмечено в 6-14 раз большее содержание целлюлозолитических бактерий, чем у *R. tarandus tarandus* (1). Однако бактерии, связанные с процессами ферментации растительных кормов, были сходными по видовому составу: *Peptostreptococcus anaerobius*, *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium*, *Selenomonas ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes*, *Eubacterium pyruvovorans* и *Fusocillus* sp. Также, по данным Т.Н. Агнес с соавт. (11), подвид *R. tarandus tarandus* имеет серьезные ограничения в переваривании клетчатки.

Молекулярно-генетические технологии, такие как T-RFLP-анализ (terminal restriction fragment length polymorphism) и NGS-секвенирование (next generation sequencing), открыли новые возможности в изучении структуры микробных сообществ, что позволяет дать глубокую характеристику их биоразнообразия, выявляя не только доминирующие таксоны, но и другие компоненты, в том числе некультивируемые микроорганизмы (12-15). Однако проведенные до настоящего времени исследования микробиома рубца северных оленей единичны (16, 17).

В настоящей работе с применением молекулярно-биологического анализа впервые показано, что одним из ключевых факторов, влияющих на формирование микробиома рубца северного оленя (*Rangifer tarandus*), служит место обитания, что, вероятно, связано с особенностями кормовой базы животных.

Цель работы состояла в оценке региональных и половозрастных особенностей микробиома рубца северных оленей, обитающих в различных природно-климатических зонах Российской Федерации, с использованием T-RFLP-анализа и количественной ПЦР.

Методика. Объектом исследования были 58 особей северных оле-

ней (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы — телята (4–8 мес) и взрослые особи (самцы и самки). Содержимое рубца северных оленей отбирали в летне-осенний период 2017 года ($n \geq 3$ из каждой возрастной группы) в Ямало-Ненецком автономном округе (АО) (п.г.т. Харп, лесотундровая природно-климатическая зона), Ненецком АО (п. Нельмин-Нос, тундровая природно-климатическая зона) и Мурманской области (ст. Лопарская, тундровая природно-климатическая зона).

Общее количество бактерий, архей и грибов класса *Neocallimastigales* в содержимом рубца анализировали методом количественной ПЦР (qRT-PCR) с использованием набора реактивов для ПЦР в реально времени (ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (ЗАО «Синтол», Россия) и праймеров F — 5'-ACTCCTACGGGAGGCA-GCAG-3', R — 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (бактерии), F — 5'-AG-GAATTGGCGGGGAGCAC-3', R — 5'-GCCATGCACCWCCTCT-3' (археи), F — 5'-GCACTTCATTTGTGTGTAAGT-3', R — 5'-GGATGAACTCG-TTGACTTC-3' (грибы) на детектирующем амплификаторе DT Lite-4 (НПО «ДНК-Технология», Россия) в следующем режиме: первый цикл — 3 мин при 95 °С (1 повтор); второй цикл — 13 с при 95 °С, 13 с при 57 °С, 30 с при 72 °С (40 повторов).

Бактериальное сообщество рубца изучали при помощи метода T-RFLP (18). ДНК из образцов извлекали набором для выделения ДНК Genomic DNA Purification Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с инструкциями производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Verity («Life Technologies», США) с бактериальными праймерами 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') с меткой на 5'-конце (флуорофор WellRed D4, «Beckman Coulter», США) и 1492R (5'-TACGGHTACSTTGTACGACTT-3'), амплифицирующими фрагмент гена 16S рРНК с 63-й по 1492-ю позицию, используя режим: первый цикл — 3 мин при 95 °С (1 повтор); второй цикл — 30 с при 95 °С, 40 с при 55 °С, 60 с при 72 °С (35 повторов); третий цикл — 5 мин при 72 °С. Итоговую концентрацию полученной тотальной ДНК определяли при помощи флуориметра Qubit 2 («Invitrogen», США) с применением наборов Qubit dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen», США) согласно рекомендациям производителя.

Ампликоны фрагмента гена 16S рРНК, меченные флуоресцентной меткой, очищали в соответствии со стандартной методикой (19). По 30–50 нг ДНК обрабатывали рестриктазами MspI, HaeIII, HhaI («Fermentas», Литва) 2 ч при температуре 37 °С. Рестриктационные продукты осаждали с помощью этанола, затем вносили 0,2 мкл маркера молекулярной массы Size Standart-600 («Beckman Coulter», США) и 10 мкл формамида Sample Loading Solution («Beckman Coulter», США). Анализ проводился на секвенаторе SEQ 8000 («Beckman Coulter», США); погрешность прибора SEQ 8000 — не более 5 %. Высоту пиков, их площадь определяли при помощи программного обеспечения Fragment Analysis («Beckman Coulter», США), в результате чего выделяли подтипы (филотипы) и рассчитывали их относительное количество в составе микробного сообщества. Таксономическую принадлежность бактерий устанавливали с использованием базы данных (<http://mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php>).

Образцы пастбищной растительности, составлявшие основу рациона северных оленей, отбирали в каждом регионе и проводили их ботаническое описание. Кроме того, определяли соотношение различных видов растений в рационе и его питательность.

Статистическую обработку результатов осуществляли методом дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Определяли средние значения (M), стандартные ошибки средних ($\pm SEM$), достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента. Расчет коэффициентов корреляции Пирсона и оценку сходства бактериальных сообществ методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) на основе коэффициента Брея-Кертиса, учитывающего количество и относительную численность определенных таксонов, осуществляли с помощью программы Past (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Результаты. На рисунке 1 показаны регионы, где осуществляли отбор образцов. Усредненный состав и питательность летне-осеннего пастбищного рациона северных оленей представлены в таблице 1.

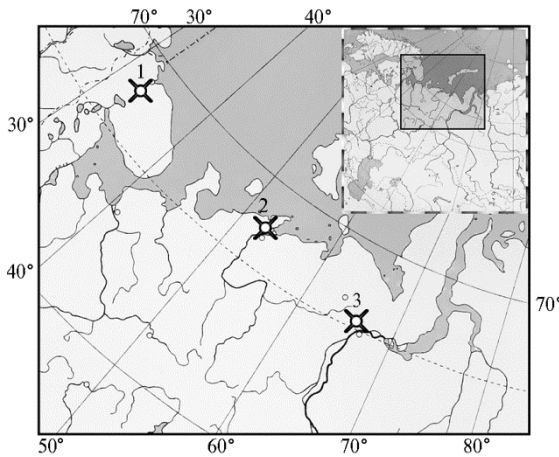


Рис. 1. Регионы отбора образцов содержимого рубца северных оленей (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы: 1 — Ямало-Ненецкий автономный округ, 2 — Мурманская область, 3 — Ненецкий АО (2017 год).

Физиология северных оленей, в том числе состояние рубцовой микрофлоры, испытывает гораздо меньшую антропогенную нагрузку, чем у одомашненных жвачных, в частности у крупного рогатого скота. Вместе с тем роль микробного сообщества рубца у жвачных в обеспечении питания особенно значима, поскольку их рацион состоит из крайне бедных по пищевой ценности растительных кормов (20). Известно, что пищеварительная система северных оленей имеет уникальные приспособления для микробиологической ферментации скудных растительных ресурсов в естественных природных условиях обитания, что может оказывать существенное селективное давление на структурно-функциональную организацию рубцового микробиома.

1. Усредненный состав и питательность летнего пастбищного рациона северных оленей (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы в трех зонах Арктической России в летне-осенний период ($M \pm SEM$, 2017 год)

Показатель	Ямало-Ненецкий АО	Мурманская область	Ненецкий АО
Показатели питательности			
Растворимые углеводы (сахара), г/кг	20,80±0,80	13,85±0,52	66,86±3,50
Массовая доля сухого вещества, %	76,74±1,60	73,28±1,73	82,04±1,46
Сырой жир, г/кг	16,90±0,61	12,39±0,84	15,46±0,54
Сырой протеин, г/кг	95,90±4,70	54,96±3,10	64,03±3,50
Сырая зола, г/кг	36,40±1,10	24,99±2,20	23,95±1,80
Сырая клетчатка, г/кг	142,80±7,30	134,62±6,50	160,55±8,60
Компоненты рациона, %			
Лишайники рода Кладония (<i>Cladonia</i>)	5	10	10
Лишайники рода Нефрома (<i>Nephroma</i>)	5	—	—
Береза обыкновенная (<i>Betula pendula</i>)	5	20	20
Ива северная (<i>Salix borealis</i>)	5	20	15
Ива полярная (<i>Salix polaris</i>)	15	—	—
Голубика обыкновенная (<i>Vaccinium uliginosum</i>)	10	—	5
Береза карликовая (<i>Betula nana</i>)	25	20	20
Смесь многолетних трав	30	30	30

Примечание. АО — автономный округ. Прочерки означают отсутствие компонента в рационе.

Рубец жвачных населен различными группами симбиотических микроорганизмов (4-7). В наших исследованиях у животных из Ямало-Ненецкого АО было отмечено достоверно большее ($p < 0,05$) количество бактерий и грибов-хитридиомицетов по сравнению с особями из других регионов (табл. 2). В рубце северных оленей из Мурманской области и Ненецкого АО зафиксировали достоверно большее ($p < 0,05$) количество архей по сравнению с животным из Ямало-Ненецкого АО.

Половозрастные различия животных по численности основных групп микроорганизмов оказались менее значимы по сравнению с региональными особенностями. Однако выявленные изменения микробиоты были неодинаковы для особей из разных регионов. Так, у северных оленей старше 2 лет из Мурманской области и Ямало-Ненецкого АО наблюдалось достоверное увеличение численности бактерий ($p < 0,05$) по сравнению с особями из Ненецкого АО. Достоверных изменений численности хитридиомицетов у животных из Мурманской области и Ненецкого АО с возрастом не наблюдали, тогда как у особей из Ямало-Ненецкого АО их отмечали.

Можно предположить, что обнаруженные нами закономерности изменения численности микроорганизмов в сообществе рубца северных оленей взаимосвязаны со структурой летнего пастбищного рациона и его питательностью, что согласуется с сообщениями зарубежных исследователей. Так, М.А. Olsen с соавт. (21) показали снижение в зимнее время численности жизнеспособных зооспор хитридиомицетов, которые обладают широким спектром многофункциональных полисахаридных ферментов (22-23), в содержимом рубца у *Norwegian reindeer*, обитающих на естественных пастбищах. Аналогичные результаты получены для метаногенных архей, численность которых снижалась в рубце у *R. tarandus* в весенний период по сравнению с осенним (24). При этом для северных оленей *R. tarandus platyrhynchus* архипелага Шпицберген показано отсутствие существенных изменений в рубце количества метаногенов, бактерий и простейших в связи со сменой состава растительности естественных пастбищ в осенний и весенний периоды (25).

2. Количество микроорганизмов в сообществе рубца у особей северных оленей (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы в возрасте до 2 лет (I) и старше 2 лет (II), обитающих в различных регионах Российской Арктики ($M \pm SEM$, 2017 год)

Регион, возраст	Общее количество бактерий	Общее количество архей	Количество грибов класса <i>Neocallimastigales</i>
Ямало-Ненецкий АО:			
I	$1,56 \times 10^9 \pm 5,38 \times 10^7$ d	$1,20 \times 10^8 \pm 3,94 \times 10^6$ d	$2,81 \times 10^6 \pm 8,24 \times 10^4$ b
II	$2,58 \times 10^9 \pm 1,84 \times 10^6$ c	$1,42 \times 10^8 \pm 6,72 \times 10^6$ d	$4,53 \times 10^6 \pm 1,95 \times 10^5$ a
Мурманская область:			
I	$8,10 \times 10^8 \pm 4,01 \times 10^3$ e	$1,03 \times 10^9 \pm 5,25 \times 10^4$ b	$2,07 \times 10^5 \pm 8,09 \times 10^2$ c
II	$1,75 \times 10^9 \pm 2,87 \times 10^8$ c, d	$7,79 \times 10^8 \pm 2,87 \times 10^6$ c	$2,07 \times 10^5 \pm 8,09 \times 10^2$ c
Ненецкий АО:			
I	$6,37 \times 10^9 \pm 4,72 \times 10^8$ a	$8,74 \times 10^7 \pm 6,02 \times 10^6$ e	$3,24 \times 10^5 \pm 9,50 \times 10^3$ c
II	$4,41 \times 10^9 \pm 2,12 \times 10^7$ b	$2,15 \times 10^9 \pm 1,56 \times 10^8$ a	$3,39 \times 10^5 \pm 5,10 \times 10^4$ c

Примечание. АО — автономный округ.

a-e Различия показателей без общего верхнего индекса статистически значимы при $p < 0,05$.

Анализ сходства бактериальных сообществ рубца у исследованных нами особей на основе метода главных компонент (рис. 2) показал, что все образцы подразделялись на три основные группы, соответствующие отдельным регионам: Мурманской области, Ямало-Ненецкому и Ненецкому АО. Обнаруженные закономерности предположительно обуславливались различиями в составе пастбищного рациона и эпизоотической ситуацией в стаде, поскольку метеорологические параметры в регионах были

сходными для летне-осеннего периода, в который проводилось исследование. Интересно, что половозрастные особенности животных, определенные методом главных компонент, показали менее значительное разделение образцов на подгруппы. В целом, наиболее значимые различия детектировали в составе бактериального сообщества рубца между группами молодняка (до 2 лет) и взрослыми особями (старше 2 лет) (см. рис. 2). Стоит отметить, что существенных изменений в составе микробного сообщества рубца у важенков (самок) и хоров (самцов) мы не обнаружили.

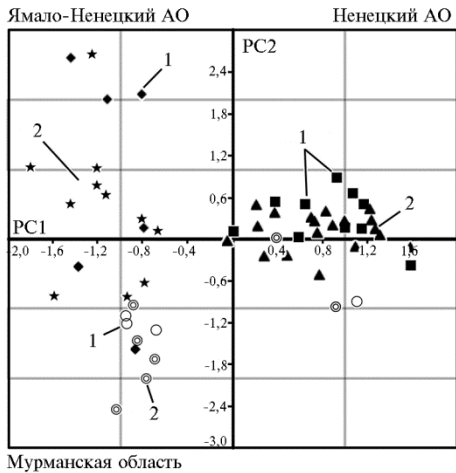


Рис. 2. Сравнительный анализ бактериального сообщества рубца северных оленей (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы, обитающих в различных регионах Российской Арктики, с применением метода главных компонент (Principal Component Analysis) по результатам T-RFLP-анализа: 1 — молодняк (до 2 лет), 2 — взрослые особи (старше 2 лет) (2017 год).

использованию различных ферментов (целлюлаз, гемицеллюлаз, ксиланаз, гликозидгидролаз и т.д.) участвуют в деградации растительной биомассы с образованием метаболитов, в том числе летучих жирных кислот (ЛЖК): пропионата, ацетата, бутирата, изобутирата, валерата, изовалерата и 2-метилбутировой, гексановой и гептановой кислот (6, 7).

Представители бактериальных филумов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* составляют преобладающую часть микробного сообщества в рубце жвачных (26, 27), что предполагает важную экологическую роль этих микроорганизмов, вероятно, благодаря их широкому метаболическому потенциалу, в том числе ферментации растительных полисахаридов. Высокая пропорциональная доля филумов *Firmicutes/Bacteroidetes*, по данным ряда авторов, характерна для различных жвачных (28, 29). Тем не менее в рубце североамериканского лося *Alces alces* показано присутствие лишь 33 % бактерий филума *Firmicutes* (29).

Сообщалось, что у северных оленей представленность бактерий этих таксонов варьирует в зависимости от местообитания. В частности, у подвида *R. tarandus tarandus* из материковой части Норвегии представленность бактерий филума *Firmicutes* (71 %) была выше, чем у особей *R. tarandus platyrhynchus* (55 %), обитающих на архипелаге Шпицберген (1). Анализ микробиоты рубца у исследованных нами особей *R. tarandus* показал, что наименьшая процентная доля представителей филума *Bacteroidetes*

Вне зависимости от региона отбора образцов у исследованных нами особей *R. tarandus* доминирующими в содержимом рубца были представители филума *Firmicutes*, в меньшей степени детектировали бактерии филумов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, доля других выявленных таксонов (*Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*) в сообществе была минорной, значительное количество бактериальных последовательностей не удалось идентифицировать до уровня филума.

Наибольший интерес у исследователей при изучении микробных сообществ рубца жвачных связан с микроорганизмами — продуцентами ферментов, не синтезируемых организмом хозяина, прежде всего целлюлозолитическими. Эти микроорганизмы, благодаря

присутствовала у животных из Ненецкого АО, а наибольшая — у северных оленей из Ямало-Ненецкого АО (рис. 3). Общая доля бактерий филума *Firmicutes* достоверно не различалась у взрослых особей из разных регионов, тогда как у молодняка из Мурманской области численность этих микроорганизмов была достоверно ниже ($p < 0,05$), чем у особей из Ненецкого и Ямало-Ненецкого АО.

Данные о представленности в рубце северных оленей бактерий, взаимосвязанных с процессами ферментации растительной клетчатки, согласуются с результатами оценки питательности растений с пастбищ. Состав и питательность многокомпонентных проб, повторяющих состав усредненного летнего пастбищного рациона из трех регионов Арктической зоны России, различались. В целом, корма северных оленей характеризовались высоким содержанием сырой клетчатки и низким — других питательных веществ. По составу микробиома рубца северные олени из Мурманской области имели наименьшее сходство с особями из других регионов, что, вероятно, обусловлено особенностями пастбищного рациона животных в этом регионе — составом растительности и меньшими показателями питательности (см. табл. 1).

Сообщалось, что пропорция филумов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в рубце жвачных зависит от типа питания. Так, представители филума *Bacteroidetes* в основном связаны с наличием в рационе животных легко сбраживаемых углеводов (таких как крахмал) и белков, тогда как ряд представителей филума *Firmicutes* (бактерии родов *Ruminococcus*, *Butirivibrio*, *Clostridium* и др.) — с ферментацией растительной целлюлозы (7, 10, 30). Различие ферментативной активности этих микроорганизмов может оказывать влияние и на метаболизм хозяина через продукцию ЛЖК в результате ферментации растительных полисахаридов.

Интересно, что у взрослых особей по сравнению с молодыми отмечалось более широкое таксономическое разнообразие бактерий, связанных с ферментацией клетчатки, в том числе семейств *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* филума *Firmicutes* ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о повышении способности микробного сообщества ферментировать растительные полисахариды.

Мы обнаружили статистически значимую корреляцию между составом микроорганизмов рубца *R. tarandus*, участвующих в ферментации растительных полисахаридов, и показателями питательности рационов. В частности, количество клетчатки было достоверно отрицательно связано с представленностью в рубце животных семейств *Bacteroidaceae* ($r = -0,75$, $p < 0,05$), *Rivulariaceae* ($r = -0,88$, $p < 0,05$), *Veillonellaceae* ($r = -0,75$, $p < 0,05$) и достоверно положительно — с присутствием семейств *Lachnospiraceae* ($r = 0,89$, $p < 0,05$), *Clostridiaceae* ($r = 0,51$, $p < 0,05$), *Nostocaceae* ($r = 0,52$, $p < 0,05$), *Eubacteriaceae* ($r = 0,46$, $p < 0,05$), *Prevotellaceae* ($r = 0,56$, $p < 0,05$).

Представленность некоторых целлюлозолитических микроорганизмов (например, семейств *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae*) была положительно взаимосвязана ($p < 0,05$) с долей бактерий из семейств *Nostocaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* и отрицательно ($p < 0,05$) — с представителями семейств *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Veillonellaceae*, *Streptococcaceae*. Интересно, что у исследованных нами северных оленей наблюдалась обратная закономерность между содержанием в рубце утилизирующих кислоты бактерий семейств *Veillonellaceae* и целлюлозолитических микроорганизмов, таких как *Lachnospiraceae* ($r = -0,60$, $p < 0,05$),

Clostridiaceae ($r = -0,55$, $p < 0,05$), *Eubacteriaceae* ($r = -0,60$, $p < 0,05$). Бактерии, утилизирующие кислоты, относятся к физиологически важной для жвачных группе микроорганизмов, поскольку они позволяют поддерживать в рубце необходимую кислотность благодаря способности метаболизировать образующиеся в результате сбраживания моносахаров, олиго- и полисахаридов кислоты (включая уксусную, пропионовую, масляную, молочную) (31).

Выявленные нами закономерности подтверждают мнение о том, что в процессе эволюции в рубце животных сформировались определенные связи между микроорганизмами и позволяют уточнить взаимосвязь между присутствием ряда микроорганизмов в рубце северных оленей.

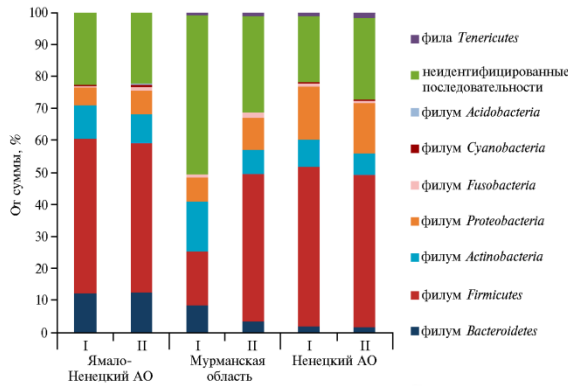


Рис. 3. Соотношение бактериальных филумов в рубце северных оленей (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы, обитающих в различных регионах Российской Арктики (2017 год): I — в возрасте до 2 лет, II — старше 2 лет.

Значимой взаимосвязи между содержанием условно-патогенных микроорганизмов из филумов *Fusobacteria*, *Tenericutes* (семейство *Mycoplasmataceae*), *Proteobacteria* (семейства *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteraceae*) и других микро-

организмов мы не обнаружили. Однако для углубленного изучения этой проблемы необходимы дополнительные исследования. Прямой закономерности, характеризующей возрастные изменения в содержании условно-патогенных и патогенных бактерий в рубце у *R. tarandus*, мы также не обнаружили. Вероятно, выявленные при этом различия были связаны с другими факторами — особенностями пастбищного рациона и эпизоотической ситуацией в стаде.

Таким образом, выполненные нами исследования показали, что у особой северного оленя (*Rangifer tarandus*) ненецкой породы старше 2 лет из Мурманской области и Ямало-Ненецкого АО (но не Ненецкого АО) численность бактерий достоверно увеличивается ($p < 0,05$) по сравнению с показателями у телят. Независимо от региона в содержимом рубца доминирует филум *Firmicutes*, менее представлены бактерии филумов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, доля других выявленных таксонов (*Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*) минорна. Выявлены значимые изменения для ряда таксонов микроорганизмов в связи с показателями питательности пастбищного рациона в зависимости от региона. Установлена статистически значимая связь между содержанием клетчатки в пастбищных кормах и численностью членов семейств *Veillonellaceae* ($r = -0,75$), *Nostocaceae* ($r = 0,52$), *Rivulariaceae* ($r = -0,88$). Для условно-патогенных микроорганизмов из филумов *Fusobacteria*, *Tenericutes* (семейство *Mycoplasmataceae*) и *Proteobacteria* (семейства *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteraceae*) подобных закономерностей не отмечено. В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что условия обитания — главный фактор, оказывающий влияние на микробное сообщество рубца северных оленей из различных регионов Российской Арктики. Вероятнее всего, это связано с особенностями кормо-

вых рационов животных. Другие факторы (пол, возраст) оказывают меньшее влияние, хотя и вносят определенный вклад в соотношение микроорганизмов в рубце. Результаты, полученные с использованием метагеномных методов анализа (благодаря их высокой разрешающей способности) позволяют открыть новые закономерности и уточнить аспекты взаимодействия и совместного обитания симбионтов в сложной экосистеме рубца северных оленей *R. tarandus*.

¹ООО «БИОТРОФ+»,

192284 Россия, г. Санкт-Петербург, Загребский б-р, 19, корп. 1,
e-mail: ilina@biotrof.ru ✉, deniz@biotrof.ru, filippova@biotrof.ru,
timur@biotrof.ru, dubrowin.a.v@yandex.ru, sdv@biotrof.ru,
natalia-iv-nov@rambler.ru, georg-laptev@rambler.ru;

²ФГБУ Северо-Западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 7,
e-mail: layshev@mail.ru, alyuzhakov@mail.ru;

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

Поступила в редакцию
28 апреля 2019 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 6, pp. 1177-1187

HABITAT AS A DETERMINING FACTOR FOR THE REINDEER RUMEN MICROBIOME FORMATION IN RUSSIAN ARCTIC

L.A. Ilina¹, K.A. Layshev², E.A. Yildirim¹, V.A. Philippova¹, T.P. Dunnyashev¹,
A.V. Dubrovin¹, D.V. Sobolev¹, N.I. Novikova¹, G.Yu. Laptev¹, A.A. Yuzhakov²,
T.M. Romanenko³, Yu.P. Vylko³

¹JSC Biotrof+, 19 corp. 1, Zagrebsskii bulv., St. Petersburg, 192284 Russia, e-mail ilina@biotrof.ru (✉ corresponding author), deniz@biotrof.ru, filippova@biotrof.ru, timur@biotrof.ru, dubrowin.a.v@yandex.ru, sdv@biotrof.ru, natalia-iv-nov@rambler.ru, georg-laptev@rambler.ru;

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

³Lavrov Federal Center for Integrated Arctic Research (FCIARctic) RAS, Naryan-Mar Agro-Experimental Station, 1a, ul. Rybnikov, Naryan-Mar, Nenets AO, 166004 Russia, e-mail nmshos@atnet.ru, vylcko.yury@yandex.ru
ORCID:

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

Layshev K.A. orcid.org/0000-0003-2490-6942

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

Philippova V.A. orcid.org/0000-0001-8789-9837

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

Dubrovin A.V. orcid.org/0000-0001-8424-4114

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation for project No. 17-76-20026 “Rumen microbiocenosis in *Rangifer tarandus* of the Russian Arctic as a fundamentals for promising animal biotechnologies”

Received April 28, 2019

doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1177eng

Abstract

Reindeer (*Rangifer tarandus*) is geographically isolated from other subspecies of the ruminant family *Cervidae*. It is known that belonging to certain environmental conditions can have a significant impact on the composition of the ruminant rumen microbiome. With the use of molecular-biological analysis, we studied for the first time the patterns of formation of the reindeer's rumen microbial communities for the *Rangifer tarandus* living in different natural and climatic zones of the Russian Federation. The purpose of the study is to assess the regional features of the reindeer's rumen microbiome into the different Arctic regions of Russia using T-RFLP analysis and quantitative PCR. It was made a comparative analysis of the influence of a number of factors on the composition of the reindeer rumen microbiome, incl. gender and age peculiarities, regional habitat conditions and feeding ration features. Samples of the rumen content were collected in the summer-autumn period

of 2017 from 58 individuals ($n \geq 3$ from each age group) in the Yamalo-Nenets Autonomous District (AO), Nenets Autonomous District and the Murmansk region. The total number of bacteria, archaea, and fungi of the *Neocallimastigales* was analyzed by quantitative PCR, and the composition of the bacterial community by T-RFLP (terminal restriction fragment polymorphism) method. The main determinant of all components of the microbial community of the reindeer's rumen is regional habitat conditions, which, apparently, is due to differences in the composition of the pasture diet and the epizootic situation in the herd. The smallest similarity with other regions was found for samples from the Murmansk region, which is probably due to differences in reindeer pasture ration in this region, i.e. the differences in the composition of vegetation and lower nutritional values. Gender and age differences of animals were less significant though made a certain contribution to the ratio of microorganisms in the rumen. The clearest differences in the rumen microbiota were detected between groups of animals under 2 years of age and older than 2 years. In general, significant changes in the representation of a taxa number were noted in connection with the nutritional value of pasture ration. A statistically significant relationship was established between the level of fiber in grazing feed and members of the families *Veillonellaceae* ($r = -0.75$), *Nostocaceae* ($r = 0.52$), *Rivulariaceae* ($r = -0.88$), etc. in addition to traditionally associated with the processes of cellulose degradation bacteria. There is no significant correlation between the content of conditionally pathogenic microorganisms from the *Fusobacteria*, *Tenericutes* (*Mycoplasmataceae*), *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*, *Campylobacteraceae*) and the nutritional value of feeds and other groups of microorganisms, which indicates the need for more research in this direction. The obtained data clarify aspects of the interaction and cohabitation of symbionts in the complex-component system of the reindeer rumen, which is characterized by the diversity of sources of plant polysaccharides and the variety of enzymes produced by microorganisms.

Keywords: *Rangifer tarandus*, T-RFLP analysis, quantitative PCR, rumen microbiome, reindeer, Russian Arctic.

REFERENCES

1. 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(3): 424-438 (doi: 10.1007/s00248-007-9254-x).
2. Malmuthuge N., Guan L.L. Gut microbiome and omics: a new definition to ruminant production and health. *Animal Frontiers*, 2016, 6(2): 8-12 (doi: 10.2527/af.2016-0017).
3. Matthews C., Crispie F., Lewis E., Reid M., O'Toole P.W., Cotter P.D. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*, 2019, 10(2): 115-132 (doi: 10.1080/19490976.2018.1505176).
4. Hackmann T.J., Spain J.N. Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(4): 1320-1334 (doi: 10.3168/jds.2009-2071).
5. Morgavi D.P., Kelly W.J., Janssen P.H., Attwood G.T. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *Animal*, 2013, 7(1): 184-201 (doi: 10.1017/S1751731112000419).
6. *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition*. D.C. Church (ed.). Prentice Hall, New Jersey, 1993.
7. Hungate R.E. *The rumen and its microbes*. Academic Press, NY, 1966.
8. Grilli D.J., Fliegerová K., Kopečný J., Lama S.P., Egea V., Sohaefer N., Pereyra C., Ruiz M.S., Sosa M.A., Arenas G.N., Mrázek J. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe*, 2016, 42: 17-26 (doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.07.002).
9. 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.
10. Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Global Rumen Census Collaborators, Janssen P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 14567 (doi: 10.1038/srep14567).
11. Aagnes T.H., Sørmo W., Mathiesen S.D. Ruminal microbial digestion in free-living, in captive lichen-fed, and in starved reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in winter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61(2): 583-591.
12. 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).
13. 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).

- 10.1371/journal.pone.0154354).
14. Peng S., Yin J., Liu X., Jia B., Chang Z., Lu H., Jiang N., Chen Q. First insights into the microbial diversity in the omasum and reticulum of bovine using Illumina sequencing. *J. Appl. Genetics*, 2015, 56(3): 393-401 (doi: 10.1007/s13353-014-0258-1).
 15. Elekwachi C.O., Wang Z., Wu X., Rabee A., Forster R.J. Total rRNA-Seq analysis gives insight into bacterial, fungal, protozoal and archaeal communities in the rumen using an optimized RNA isolation method. *Front. Microbiol.*, 2017, 8: 1814 (doi: 10.3389/fmicb.2017.01814).
 16. 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).
 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. Lapt'ev 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 rogotogo skota* [The standards of microflora in cattle rumen]. St. Petersburg, 2016 (in Russ.).
 19. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., *Molekulyarnoe klonirovanie* [Molecular cloning]. Moscow, 1984 (in Russ.).
 20. Zabrodin V.A., Laishev K.A., Dubovik I.K. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2015, 40: 108-112 (in Russ.).
 21. Olsen M.A., Aagnes T.H., Mathiesen S.D. The effect of timothy silage on the bacterial population in rumen fluid of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) from natural summer and winter pasture. *FEMS Microbiol Ecol.*, 1997, 24(2): 127-136 (doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00429.x).
 22. 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. Microbiol.*, 1985, 50(1): 144-151.
 23. Wang T.Y., Chen H.L., Lu M.J., Chen Y.C., Sung H.M., Mao C.T., Cho H.Y., Ke H.M., Hwa T.Y., Ruan S.K., Hung K.Y., Chen C.K., Li J.Y., Wu Y.C., Chen Y.H., Chou S.P., Tsai Y.W., Chu T.C., Shih C.A., Li W.H., Shih M.C. Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. *Biotechnol. Biofuels*, 2011, 4: 24 (doi: 10.1186/1754-6834-4-24).
 24. Fonty G., Joblin K.N. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (eds.). Academic Press, Toronto, ON, 1990: 665-680 (doi: 10.1016/B978-0-12-702290-1.50033-3).
 25. 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(2): 335-348 (doi: 10.1007/s00248-008-9414-7).
 26. Schofield B.J., Lachner N., Le O.T., McNeill D.M., Dart P., Ouwerkerk D., Hugenholtz P., Klieve A.V. Beneficial changes in rumen bacterial community profile in sheep and dairy calves as a result of feeding the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* H57. *J. Appl. Microbiol.*, 2018, 124(3): 855-866 (doi: 10.1111/jam.13688).
 27. Weimer P.J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 296 (doi: 10.3389/fmicb.2015.00296).
 28. Samsudin A.A., Evans P.N., Wright A.G., Jassim R.A. Molecular diversity of the foregut bacteria community in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Environmental Microbiology*, 2011, 13(11): 3024-3035 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02579.x).
 29. Ishaq S.L., Wright A.D. Insight into the bacterial gut microbiome of the North American moose (*Alces alces*). *BMC Microbiol.*, 2012, 12: 212 (doi: 10.1186/1471-2180-12-212).
 30. McCann J.C., Elolimy A.A., Loor J.J. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2017, 33(3): 539-553 (doi: 10.1016/j.cvfa.2017.06.009).
 31. Nocek J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80: 1005-1028 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0).