

10. **Lapshin S.A.** Novoe v mineral'nom pitanii sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. – M.: Rosagropromizdat, 1988. – 207s.
11. **Samohin V.T.** Profilaktika narushenij obmena mikroelementov u zhivotnyh. – Voronezh: Voronezhskij gos. un-t, 2003. – 136 s.

УДК 576.64

DOI 10.24411/2078-1318-2019-12080

Аспирант **Т.П. ДУНЯШЕВ**  
(ФГБОУ ВО СПбГАУ, ООО «БИОТРОФ+», timur@biotrof.ru)  
Канд. биол. наук **Д.В. СОБОЛЕВ**  
(ООО «БИОТРОФ+», sdv@biotrof.ru)  
Доктор биол. наук **Г.Ю. ЛАПТЕВ**  
(ФГБОУ ВО СПбГАУ, ООО «БИОТРОФ+»,  
georg-laptev@rambler.ru)

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА РУБЦА У МОЛОДЫХ И ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ *RANGIFER TARANDUS* ИЗ АРКТИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ РОССИИ В ОСЕННЕ-ЗИМНИЙ ПЕРИОД\*

С северным оленеводством в Российской Федерации прямо или косвенно связаны представители 18 коренных малочисленных народов, которые включают свыше 130 тысяч человек, преимущественно сельских жителей. Статистические и исторические данные показывают, что за годы неоднократных экономических и идеологических реформ в сельском хозяйстве, интенсивного промышленного освоения территории Крайнего Севера только ненцы смогли сохранить оленеводство в полном объеме [1].

Известно, что рубец северных оленей населен симбиотическими микроорганизмами: бактериями, грибами, археями, простейшими. Микрофлора рубца северного оленя играет важную роль в ферментации растительных кормов [2-3]. В летний период олени находятся на пастбищном содержании, их рацион состоит из смеси многолетних трав и кустарников. Зимой рацион северного оленя на 70% состоит из лишайников, которые очень токсичны для многих животных, например, для овец, коров из-за содержания в них усниновой кислоты – метаболита лишайников. К немаловажным функциям анаэробной микрофлоры рубца северных оленей относят ее способность к детоксификации вторичных фенольных метаболитов лишайников: усниновой кислоты и др. [3-4]. Современные знания о микробной экосистеме рубца жвачных в значительной степени основана на результатах исследования КРС, овец [5].

Микробиом рубца у северного оленя меньше изучен по сравнению с другими животными, хотя его анализ представляет значительный интерес в связи с оценкой адаптационно-физиологических и анатомических особенностей организма, позволяющих использовать низкий по питательности рацион тундры и лесотундры. В настоящей работе выполнены молекулярно-генетические исследования микробиоценоза рубца северных оленей ненецкой породы, обитающих на территории Ненецкого автономного округа России [2].

**Цель исследования** заключалась в сравнительной оценке таксономического состава бактериального сообщества рубца молодых и взрослых особей *Rangifer tarandus*. Состав бактериального сообщества рубца анализировали методом NGS (Next Generation Sequencing). Установлено, что до 50,30% филоотипов относилось к филуму *Bacteroidetes*. В филуме *Firmicutes* отмечено 40,82% микроорганизмов от всего бактериального сообщества рубцовой жидкости. Менее представленными оказались *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Euryarchaeota*, *Verrucomicrobia* и *Cyanobacteria*. Процентное соотношение представителей остальных филумов составляет менее 1% от всего бактериального сообщества. В течение онтогенеза у северных оленей наблюдались изменения в соотношении количества филоотипов

и таксономических групп микробиоты рубца. Наибольшие возрастные изменения были выявлены в составе филума *Firmicutes*. В рубце у телят общее содержание целлюлозолитических бактерий родов *Ruminococcus*, *Selenomonas*, обладающих потенциальной способностью к гидролизу углеводов растительных кормов с образованием летучих жирных кислот, было выше по сравнению со взрослыми особями, однако представителей рода *Streptococcus* было значительно меньше в рубцовом содержимом телят, чем у более взрослых животных. Выявлено незначительное количество условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Был выявлен высокий процент рода *Treponema* филума *Spirochaetes* у обеих возрастных групп.

**Материалы, методы и объекты исследования.** Объектом исследования были телята в возрасте полгода и взрослые особи (2-5 лет) северных оленей *Rangifer tarandus* Ненецкой породы. Образцы содержимого рубца отбирали в осенне-зимний период в 2018 году. Образцы содержимого рубца отбирали от 3-х телят и от 5-ти взрослых животных.

Молекулярно-генетические исследования микробиоты рубца проводили в лаборатории компании ООО «БИОТРОФ+» (Санкт-Петербург) с применением NGS-анализа (Next Generation Sequencing) для определения структуры (процентного содержания) компонентов бактериального сообщества. Они позволяют детектировать и определять содержание низко представленных микроорганизмов в сообществе рубца.

В данной работе мы впервые выполнили молекулярно-генетические исследования методом NGS – секвенирования рубцовой жидкости северных оленей в осенне-зимний период, обитающих на территории Ненецкого-автономного округа. Выделение тотальной ДНК для проведения молекулярно-биологических анализов осуществляли согласно методике, описанной в Маниатиса с соавторами (Маниатис и др., 1984), Ильиной (Ильина, 2013) и Ушаковой с соавторами (Ушакова и др., 2013), в собственной модификации. Тотальную ДНК из исследуемых образцов выделяли с использованием набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas, Inc.», Литва), следуя рекомендациям производителя. Концентрацию полученной ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen, Inc.», США) с использованием наборов «Quant-iT dsDNA Broad-Assay Kit» («Invitrogen, Inc.», США), согласно рекомендациям производителя. Амплификацию для последующего проведения NGS-секвенирования проводили с использованием ДНК-амплификатора Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью эубактериальных праймеров (IDT, 343F 5'-CTCCTACGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК. Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2 x 300 нт. Химерные последовательности были исключены из анализа с помощью программы [7]. Обработка полученных ридов 2 x 300 нт происходила с помощью биоинформатической платформы «CLC Bio GW 7.0» («Qiagen», Нидерланды) и включала в себя перекрывание, фильтрацию по качеству (QV>15), триммирование праймеров. Определение таксономической принадлежности микроорганизмов до рода проводили с применением программы [8].

**Результаты исследования.** В результате исследований установлено (табл.), что в микробиоте рубца исследованных нами особей *Rangifer tarandus* было выявлено 25 филумов, значительное содержание представителей было отнесено к филумам *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Spirochaetes*. В меньшей степени в сообществе рубца оказались представлены бактерии филумов *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Euryarchaeota*, *Verrucomicrobia* и *Cyanobacteria*. Остальные филумы составляют менее 1% от всего бактериального сообщества. Полученные результаты в целом соответствуют современным представлениям о микробиоте рубца как жвачных в целом, так и северных оленей в частности.

Таблица. Интегральные показатели содержания бактерий в рубце северных оленей (NGS-секвенирование), %

| Встречаемость таксона, %             | Телята<br>(6 месяцев) | Взрослые особи (3-5 лет) |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Филум <i>Bacteroidetes</i> , в т.ч.  | 47,37                 | 50,30                    |
| Род <i>Dysgonomonas</i>              | 6,37                  | 6,20                     |
| Род <i>Paraprevotella</i>            | 3,90                  | 4,06                     |
| Род <i>Sphingobacterium</i>          | 5,52                  | 4,55                     |
| Род <i>Prevotella</i>                | 22,25                 | 24,74                    |
| Род <i>Sphingobacterium</i>          | 5,52                  | 4,55                     |
| Филум <i>Firmicutes</i> , в т.ч.     | 40,82                 | 37,62                    |
| Род <i>Blautia</i>                   | 5,35                  | 4,20                     |
| Род <i>Clostridium</i>               | 2,45                  | 2,36                     |
| Род <i>Lachnospira</i>               | 1,33                  | 1,20                     |
| Род <i>Succiniclaticum</i>           | 6,96                  | 6,55                     |
| Род <i>Ruminococcus</i>              | 5,22                  | 3,83                     |
| Род <i>Selenomonas</i>               | 1,06                  | 0,50                     |
| Род <i>Streptococcus</i>             | 0,52                  | 2,22                     |
| Филум <i>Proteobacteria</i> , в т.ч. | 1,84                  | 2,05                     |
| Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>  | 0,02                  | 0,02                     |
| Семейство <i>Enterococcaceae</i>     | 0,08                  | 0,06                     |
| Семейство <i>Campylobacteraceae</i>  | 0,11                  | 0,12                     |
| Филум <i>Spirochaetes</i> , в т.ч.   | 2,25                  | 2,15                     |
| Род <i>Treponema</i>                 | 2,18                  | 2,06                     |
| Филум <i>Actinobacteria</i>          | 0,64                  | 0,75                     |
| Филум <i>Verrucomicrobia</i>         | 1,47                  | 2,14                     |
| Филум <i>Tenericutes</i>             | 0,27                  | 0,32                     |
| Филум <i>Cyanobacteria</i>           | 1,42                  | 0,97                     |
| Филум <i>Euryarchaeota</i>           | 2,61                  | 1,41                     |
| Филум <i>Planctomycetes</i>          | 0,17                  | 0,13                     |
| Филум <i>Nitrospirae</i>             | 0,60                  | 0,55                     |
| Филум <i>Chloroflexi</i>             | 0,53                  | 0,56                     |
| Филум <i>Synergistetes</i>           | 0,26                  | 0,51                     |

Известно, что ряд представителей таксонов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* проявляют способность к детоксикации усниновой кислоты и других вторичных метаболитов, продуцируемых лишайниками. Кроме того, они синтезируют целлюлозолитические ферменты, способные расщеплять клетчатку, которая содержится в значительных количествах в растениях, входящих в состав кормовой базы северного оленя.

В зависимости от возраста животных в структуре микробиома рубцового содержимого северных оленей мы выявили ряд сходств и различий. Наибольшие возрастные изменения были выявлены в составе филума *Firmicutes*. В рубце у телят общее содержание целлюлозолитических бактерий родов *Ruminococcus*, *Selenomonas*, обладающих потенциальной способностью к гидролизу углеводов растительных кормов с образованием летучих жирных кислот, было достоверно выше по сравнению со взрослыми особями, однако представителей рода *Streptococcus* было значительно меньше в рубцовом содержимом телят, чем у более взрослых животных.

Выявлено незначительное количество условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Количество данных бактерий с возрастом незначительно изменялось. Был выявлен высокий процент рода *Treponema* филума *Spirochaetes* в обеих возрастных группах. Трепонема являются возбудителями спирохетозов.

**Выводы.** Следует отметить, что по сообщению авторов Л.А. Ильиной и Т.П. Дуняшева, при сравнении бактериального сообщества рубца северных оленей из разных регионов наблюдались заметные различия в их составе [6]. В данном исследовании животные обитали в одном ареале (с одинаковыми погодными условиями и одинаковым пастбищным рационом), поэтому различия в составе микроорганизмов, населяющих рубец, в процессе онтогенеза были выявлены в незначительном количестве.

*\*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».*

### Литература

1. Мухачев А.Д., Лайшев К.А. Мир северного оленя. – Норильск, 2007. – 14 с.
2. Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. – М.: Научный мир, 2006. – 188 с.
3. 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*) // Applied and Environmental Microbiology. – 1985 – V. 50(1). – P.144-151.
4. Sundset M.A., Kohn A., Mathiesen S.D., Praesteng K.E. *Eubacterium rangiferina*, a novel uscing acid-resistant bacterium from the reindeer rumen // Natirwissenschaften. – 2008. – V. 95. – P.721-749.
5. Jami E., Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals // PLoS ONE. – 2012. – V. 7(3): e33306.
6. Ильина Л.А., Лайшев К.А., Ылдырым Е.А. и др. Сравнительный анализ бактериального сообщества рубца у молодых и взрослых особей *Rangifer tarandus* из арктических регионов России в летне-осенний период // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т.53. – №2. – С.355-363.
7. USEARCH [Электронный ресурс].- URL: <http://drive5.com/usearch>. (дата обращения: 20.02.2019).
8. RDP Classifier [Электронный ресурс].- URL: <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>. (дата обращения: 20.02.2019).

### Literatura

1. Muhachev A.D., Lajshev K.A. Mir severnogo olenya. – Noril'sk, 2007. – 14 s.
2. Tarakanov B.V. Metody issledovaniya mikroflory pishchevaritel'nogo trakta sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh i pticy. – M.: Nauchnyj mir, 2006. – 188 s.
3. 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*) // Applied and Environmental Microbiology. – 1985 – V. 50(1). – P.144-151.
4. Sundset M.A., Kohn A., Mathiesen S.D., Praesteng K.E. *Eubacterium rangiferina*, a novel uscing acid-resistant bacterium from the reindeer rumen // Natirwissenschaften. – 2008. – V. 95. – P.721-749.
5. Jami E., Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals // PLoS ONE. – 2012. – V. 7(3): e33306.
6. Il'ina L.A., Lajshev K.A., Jyldyrym E.A. i dr. Sravnitel'nyj analiz bakterial'nogo soobshchestva rubca u molodyh i vzroslyh osobej Rangifer tarandus iz arkticheskikh regionov Rossii v letne-osennij period // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. – 2018. – Т.53. – №2. – S.355-363.
7. USEARCH [Elektronnyj resurs].- URL: <http://drive5.com/usearch>. (data obrashcheniya: 20.02.2019).
8. RDP Classifier [Elektronnyj resurs].- URL: <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>. (data obrashcheniya: 20.02.2019).