

Л. А. Ильина¹, Г. Ю. Лаптев¹, Е. А. Йылдырым¹, Т. П. Дуняшев¹, А.В. Дубровин¹, К.А. Лайшев²

Возрастные отличия бактериального состава рубца северных оленей Российской Арктики

Аннотация. Оленеводство относится к стратегически значимой отрасли, связанной с обеспечением населения Арктических регионов нашей страны продовольствием. Поэтому актуальной задачей является углубление сведений об особенностях адаптационных приспособлений северных оленей.

Важную роль в жизнедеятельности *Rangifer tarandus* играют микроорганизмы-симбионты рубца, позволяющие животным эффективно использовать скудные питательные ресурсы тундры и лесотундры. Однако микробное сообщество рубца северных оленей, а также его возрастные изменения являются наименее изученными по сравнению с другими жвачными.

В настоящем исследовании впервые представлены результаты сравнительного анализа состава бактериального сообщества рубца телят (4 месяца), молодняка (1–2 года) и взрослых особей (3–6 лет) *Rangifer tarandus* Российской Арктики. Образцы содержимого рубца отбирали в летне-осенний период в 2017 году от трех животных из каждой возрастной группы в Ямало-Ненецком автономном округе. Состав бактериального сообщества рубца северных оленей анализировали в лаборатории компании «БИОТРОФ+» методом T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism).

Общий спектр выявляемых у молодняка и взрослых особей северных оленей филоотипов бактерий был высоким и более разнообразен по сравнению с 4-месячными телятами ($P < 0,05$). Большая часть филоотипов относилась к филуму Firmicutes, в меньшей степени — Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria, в минорном количестве — Tenericutes и Fusobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria. Выявлено значительное содержание неидентифицируемых филоотипов, наибольшее количество которых детектировано у молодняка ($P < 0,05$).

В процессе онтогенеза у животных наблюдались значимые изменения представленности микроорганизмов, наибольшие из которых отмечены для микроорганизмов, принимающих участие в ферментации углеводов кормов. Содержание целлюлозолитических бактерий класса Clostridia и кислот-утилизирующих видов класса Negativicutes снижалось с возрастом ($P < 0,05$), а бактерий с амило- и целлюлозолитическими свойствами филума Bacteroidetes, напротив, увеличивалось ($P < 0,05$).

У северных оленей выявлен широкий спектр микроорганизмов, которые традиционно относятся к возбудителям различных заболеваний животных и человека. С возрастом у животных отмечена тенденция к увеличению представленности ряда патогенов, включая бактерии семейств Campylobacteraceae, Burkholderiaceae, филума Fusobacteria, рода Staphylococcus. Наибольшая доля условно-патогенных микроорганизмов, включая актиномицеты филума Actinobacteria и семейства Enterobacteriaceae, выявлялась у молодняка.

Ключевые слова: северные олени, *Rangifer tarandus*, микробиом рубца, бактериальное сообщество, молекулярно-генетические методы, T-RFLP-анализ, онтогенез, летне-осенний период, Российская Арктика.

Авторы:

Ильина Лариса Александровна — кандидат биологических наук, начальник молекулярно-генетической лаборатории; e-mail: ilina@biotrof.ru;

Лаптев Георгий Юрьевич — доктор биологических наук, директор, Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ+»; e-mail: georg-laptev@rambler.ru;

Йылдырым Елена Александровна — кандидат биологических наук, биотехнолог; e-mail: deniz@biotrof.ru;

Дуняшев Тимур Петрович — аспирант, биотехнолог, +7 (812) 322-85-50; e-mail: timur@biotrof.ru;

Дубровин Андрей Валерьевич — аспирант, биотехнолог; e-mail: dubrowin.a.v@yandex.ru;

Лайшев Касим Анверович — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН; e-mail: layshev@mail.ru.

¹ Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ+», Россия, 192284, г. Санкт-Петербург, Загребский б., д. 19, корп. 1, кв. 13.

² ФГБНУ «Северо-Западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения», Россия, 196608, г. Санкт-Петербург — Пушкин, шоссе Подбельского, д. 7

Введение. Северный олень — уникальный вид животного, который в результате расширения ареала обитания приобрел специфические приспособления для жизни в условиях Севера. Это животные, которые могут эффективно использовать для питания скудные растительные ресурсы обширных пространств тундры, лесотундры, северной тайги. Так, например, доля усваиваемых северными оленями углеводов лишайников может достигать 90% [1].

Усвоение растительных полисахаридов у северных оленей происходит, как и у остальных жвачных животных — благодаря ферментам, синтезируемым микроорганизмами-симбионтами рубца [2]. Однако среди других представителей жвачных, в т. ч. семейства *Bovidae*, северные олени *Rangifer tarandus* являются наименее изученными в данном отношении.

Соответственно вопрос возрастных изменений микробного сообщества рубца северных оленей практически не освещен, хотя и представляет значительный интерес в связи изучением адаптационных приспособлений их организма к неблагоприятным условиям ареала обитания и питания.

По современным представлениям, полученным на основе молекулярно-генетических исследований, установлено, что общее разнообразие симбиотических микроорганизмов в рубце жвачных животных может достигать нескольких тысяч видов, включая бактерии, грибы, археи, простейшие, большинство среди которых являются строго анаэробными некультивируемыми и неидентифицируемыми видами [1, 3].

Наиболее информативными для исследования микробиоты рубца являются методы, направленные на изучение структуры сообщества в целом, к примеру, NGS-секвенирование и T-RFLP-анализ. Данные методы позволяют детектировать и определять содержание низкопредставленных микроорганизмов в сообществе рубца жвачных, что про-

демонстрировано в исследованиях на КРС [4–5], овцах [6–7], оленях [8], козах [9–10].

Ранее с применением T-RFLP-анализа нами были проведены детальные исследования возрастных изменений микробиоты в рубце крупного рогатого скота, которые продемонстрировали развитие микробного сообщества, сопряженное с ростом телят и изменением их питательного рациона [11].

В данном исследовании мы впервые на основе молекулярно-генетического анализа изучили возрастные изменения бактериального сообщества рубца северных оленей Российской Арктики.

Целью работы являлось сравнение таксономического состава бактерий, представленных в рубце телят, молодняка и взрослых особей *Rangifer tarandus*.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования были телята (4 месяца), молодые (1–2 года) и взрослые особи (3–6 лет) северных оленей *Rangifer tarandus* Ненецкой породы. Образцы содержимого рубца отбирали в летне-осенний период в 2017 году от трех животных из каждой возрастной группы в Ямало-Ненецком автономном округе (п.г.т. Харп, лесотундровая природно-климатическая зона). Данные об усредненном составе летнего пастбищного рациона северных оленей представлены в таблице 1.

Состав бактериального сообщества рубца северных оленей анализировали методом T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) [11].

Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-амплификацию проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью зубактериальных праймеров 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце (флуорофор WellRed D4,

Таблица 1. Усредненный состав летнего пастбищного рациона северных оленей Ямало-Ненецкого АО, %

Компонент рациона	Доля компонента в общем рационе, %
Лишайники <i>Cladonia</i>	5
Лишайники <i>Nephroma</i>	5
Ива северная <i>Salix borealis</i>	5
Ива полярная <i>Salix polaris</i>	15
Голубика <i>Vaccinium uliginosum</i>	10
Береза карликовая <i>Betula nana</i>	25
Береза обыкновенная <i>Betula pendula</i>	5
Смесь многолетних трав	30

«Beckman Coulter», США) D4 — WellRed) и 1492R (TACGGHTACCTTGTTACGACTT), которые позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК с позициями от 63 до 1492 (нумерация указана для гена 16S рРНК *Esheria coli*) в режиме: 95°C — 3 мин (1 цикл); 95°C — 30 с, 55°C — 40 с, 72°C — 60 с (35 циклов), 72°C — 5 мин.

Конечную концентрацию тотальной ДНК в растворе определяли с помощью флуориметра 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 [12]. Рестрикцию 30–50 нг ДНК проводили рестриктазами HaeIII, HhaI и MspI, следуя рекомендации изготовителя («Fermentas», Литва), в течение 2 ч при 37°C. Продукты рестрикции осаждали этанолом, затем добавляли 0,2 мкл маркера молекулярного веса Size Standart-600 («Beckman Coulter», США) и 10 мкл формамида Sample Loading Solution («Beckman Coulter», США). Анализ проводили с помощью SEQ 8000 («Beckman Coulter», США) согласно рекомендациям производителя. Погрешность прибора SEQ 8000 составляла не более 5%. Вычисление размеров пиков и их площади проводили в программе Fragment Analysis («Beckman Coulter», США), на основании чего выделяли подтипы (филотипы) с принятой в исследовании погрешностью в 1 нуклеотид и определяли их относительное содержание в микробном сообществе. Принадлежность бактерий к определенной таксономической группе определяли с использованием базы данных (<http://mica.ibest.uidaho.edu/trflp.php>).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. В представленном сообщении нами впервые охарактеризованы возрастные изменения состава бактериального сообщества рубца северных оленей *Rangifer tarandus* Российской Арктики с применением молекулярно-генетического метода T-RFLP. Проводился анализ сходства между телятами 4-месячного возраста, молодняком (возраст 1–2 года) и взрослыми особями (3–6 лет). Для северных оленей первые годы жизни являются наиболее критичными, поскольку именно в этот период наблюдается наиболее высокий процент падежа, что, вероятно, обусловлено скудностью рациона питания в условиях природно-климатических зонах обитания [13].

В процессе онтогенеза в рубце *Rangifer tarandus* наблюдалось развитие бактериального сообщества, появление новых таксонов микроорганизмов (табл. 2). Спектр выявляемых у молодняка и взрослых особей филотипов бактерий был представлен более широко по сравнению с 4-месячными телятами — свыше $109,50 \pm 4,15$ ($P < 0,05$).

Большая часть бактериальных филотипов в результате оценки таксономической принадлежности была отнесена к филуму *Firmicutes*, общее процентное отношение которых наблюдалось у 4-месячных телят ($P < 0,05$).

В меньшей степени в сообществе рубца *Rangifer tarandus* оказались представлены бактерии филумов *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. В минорном количестве были выявлены представители филумов *Tenericutes* и *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*.

Также существенной оказалась доля филотипов, которых не удалось идентифицировать по базам данных. Наибольшая доля неидентифицированных таксонов наблюдалась у особей возрастом 1–2 года. Полученные результаты согласуются с результатами исследователей, которые сообщали о присутствии более высокого в сравнении с КРС и газелями Томпсона количества неидентифицированных таксонов в рубце *Rangifer tarandus* Норвегии [14]. Это свидетельствует о необходимости проведения комплекса дополнительных исследований для установления роли данных микроорганизмов в жизнедеятельности северных оленей.

Поэтому, в целом, с применением T-RFLP-анализа нами получены результаты, сопоставимые с современными представлениями о микробиоте рубца жвачных животных [1–3].

Стоит отметить некоторые отличия состава бактериального сообщества, выявленные у исследованных особей северных оленей, от других жвачных. В рубце *Rangifer tarandus* практически полностью отсутствовали целлюлозолитические бактерий семейства *Ruminococcaceae*, традиционно выявляемые в рубце КРС в значительных количествах. При этом процентное отношение бактерий семейства *Eubacteriaceae* класса *Clostridia* с целлюлозо- и сахаролитическими свойствами было, напротив, более высоким, чем сообщалось для КРС [1–2]. По сведениям некоторых авторов уникальной способностью эубактерий, в частности, вида *Eubacterium rangiferina*, является способность к детоксикации вторичных метаболитов лишайников, токсичных для других жвачных [15].

Интересным представляется и присутствие в составе микробиоты рубца северных оленей циано-

бактерий — микроорганизмов из филума *Cyano-bacteria* (17), которые являются цианобионтами лишайников.

Сравнительный анализ микробиоты рубца *Rangifer tarandus* показал наличие определенных закономерностей в развитии бактериального сообщества, связанных с возрастом животных.

Одним из показателей, характеризующих у жвачных животных микрофлору «взрослого типа», яв-

ляется ее способность к перевариванию клетчатки [16]. Результаты исследований микробиоты рубца с применением T-RFLP-анализа показали, что, судя по относительному количеству бактерий, участвующих в ферментации углеводов растительных кормов, северные олени уже в 4-месячном возрасте способны переваривать значительные количества клетчатки. При этом с возрастом доля данных микроорганизмов в рубце животных существенно не возрастала.

Таблица 2. Соотношение бактериальных таксонов в содержимом рубца телят (4 месяца), молодых (1–2 года) и взрослых (3–6 лет) особей северных оленей ($X \pm x$, Ямало-Ненецкий автономный округ)

Показатель	Возрастная группа животных		
	Телята	Молодняк	Взрослые
Количество филотипов, ед.	91,50$\pm$5,25	109,50$\pm$4,15*	163,00$\pm$7,20**
Встречаемость таксона, %			
Фила Bacteroidetes	10,12 $\pm$ 0,42	18,32 $\pm$ 0,84*	13,45 $\pm$ 0,64**
Фила Firmicutes	60,74 $\pm$ 2,14	35,93 $\pm$ 1,63*	48,65 $\pm$ 1,96**
класс Clostridia	39,03 $\pm$ 1,98	15,12 $\pm$ 0,65*	26,86 $\pm$ 1,21**
семейство Thermoanaerobacteraceae	0,16 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
семейство Lachnospiraceae	6,12 $\pm$ 0,22	2,30 $\pm$ 0,10*	2,72 $\pm$ 0,35
семейство Eubacteriaceae	21,04 $\pm$ 1,02	9,47 $\pm$ 0,34*	15,34 $\pm$ 0,48**
семейство Ruminococcaceae	—***	0,19 $\pm$ 0,01	—
семейство Clostridiaceae	11,61 $\pm$ 0,25	2,61 $\pm$ 0,20*	8,36 $\pm$ 0,38**
род Peptococcus	0,11 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02*	0,32 $\pm$ 0,01
род Lactobacillus	0,40 $\pm$ 0,12	2,66 $\pm$ 0,12*	1,12 $\pm$ 0,06**
род Bacillus	2,39 $\pm$ 0,19	4,37 $\pm$ 0,25*	5,03 $\pm$ 0,22
род Staphylococcus	—	0,10 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02**
класс Negativicutes	18,92 $\pm$ 2,20	13,68 $\pm$ 0,54*	15,33 $\pm$ 0,63
Фила Actinobacteria	8,89 $\pm$ 0,64	12,20 $\pm$ 0,52*	7,91 $\pm$ 0,30**
род Bifidobacterium	0,26 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,06*	0,21 $\pm$ 0,02**
прочие	8,63 $\pm$ 0,35	11,11 $\pm$ 0,36*	7,70 $\pm$ 0,21**
Фила Proteobacteria	7,11 $\pm$ 0,34	4,34 $\pm$ 0,21*	13,49 $\pm$ 0,34**
семейство Enterobacteriaceae	0,31 $\pm$ 0,02	1,83 $\pm$ 0,09*	1,00 $\pm$ 0,04**
семейство Campylobacteriaceae	5,99 $\pm$ 0,36	1,30 $\pm$ 0,05*	9,69 $\pm$ 0,35**
семейство Pseudomonadaceae	0,71 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,05*	0,48 $\pm$ 0,02
семейство Burkholderiaceae	0,11 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,04*	2,32 $\pm$ 0,08**
Фила Fusobacteria	0,78 $\pm$ 0,25	0,18 $\pm$ 0,01*	1,65 $\pm$ 0,05**
Фила Cyanobacteria	—	0,70 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,02
Фила Acidobacteria	—	—	0,33 $\pm$ 0,01
Неклассифицированные последовательности	12,38 $\pm$ 0,57	28,33 $\pm$ 1,12*	13,77 $\pm$ 0,95**

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

* $P < 0,05$ — различия между возрастными группами, телята/молодняк.

** $P < 0,05$ — различия между возрастными группами, молодняк/взрослые.

***- ниже предела достоверного определения методом T-RFLP.

Напротив, в процессе онтогенеза у северных оленей отмечено достоверное снижение общего содержания бактерий класса *Clostridia* ($P < 0,05$), которые потенциально обладают способностью к ферментации полисахаридов растительных кормов с образованием ЛЖК (летучих жирных кислот). У 4-месячных телят доля бактерий семейства *Clostridiaceae* (представителей класса *Clostridia*) была достоверно более высокой ($P < 0,05$). У молодняка северных оленей отмечена тенденция к снижению уровня ряда представителей класса *Clostridia*, включая бактерии семейств *Eubacteriaceae* и *Clostridiaceae*. Относительная численность данных микроорганизмов у 4-месячных телят и взрослых особей была достоверно более высокой ($P < 0,05$). Содержание других микроорганизмов, обладающих способностью ферментировать крахмал, клетчатку, ряд других углеводов, белков, а также дезаминировать аминокислоты, из филума *Bacteroidetes* (включающего роды *Bacteroides*, *Prevotella*) достоверно увеличивалось ($P < 0,05$) с возрастом животных.

Характеристика выявленных возрастных изменений требует уточнения и проведения дополнительных исследований, поскольку полученные тенденции могут иметь связь как с физиологическими особенностями данного этапа развития животных, так и с другими факторами.

Представленность в рубце изучаемых особей микроорганизмов класса *Negativicutes*, способных к утилизации образуемых при сбраживании моно-, олиго-, полисахаридов, кислот (включая пропионовую, уксусную, масляную, молочную и др.), была высокой и имела тенденцию к снижению в онтогенезе ($P < 0,05$). О присутствии у северных оленей селеномонад (включая *Selenomonas ruminantium*), которые относятся к бактериям класса *Negativicutes*, сообщалось в трудах Б.В. Тараканова [3], который показал, что по внешнему виду и разнообразию они существенно отличаются от видов, встречающихся у КРС.

Кислот-утилизирующие бактерии относятся к физиологически важной группе микроорганизмов для жвачных, поскольку позволяют поддерживать в рубце необходимый уровень кислотности. Так, широко описанным в литературе является факт о том, что кислот-утилизирующие представители родов *Dialister*, *Megasphaera*, *Selenomonas* у КРС утилизируют лактат, не позволяя ему накапливаться в рубце, и, соответственно, препятствуют снижению физиологического уровня pH и развитию лактатного ацидоза [11, 17].

У исследованных нами северных оленей отмечена обратная закономерность между содержанием бактерий класса *Negativicutes* и микроорганизмов рода *Lactobacillus*, основным метаболитом которых является преимущественно лактат, что подтверждает значимость кислот-утилизирующих бактерий для жвачных животных.

Разнообразие патогенных и условно-патогенных бактерий в рубце северных оленей практически не описано в литературе. Наиболее изученными в этом отношении являются возбудители некробактериоза *Fusobacterium necrophorum*, поскольку некробактериоз в зимний период нередко становится причиной массовой гибели молодняка. Так, показано, что у КРС фузобактерии способны проникать в кровь, инфицируя организм животных с развитием абсцессов печени, поражений копыт, кожи, слизистых [11, 13, 17].

По результатам проведения T-RFLP-анализа у исследованных северных оленей в рубце установлено присутствие широкого спектра микроорганизмов, которые традиционно относятся к возбудителям различных заболеваний животных и человека. Наиболее высокой в рубце *Rangifer tarandus* была относительная численность филума *Actinobacteria* и семейств *Campylobacteriaceae* и *Enterobacteriaceae*. В меньшей степени у северных оленей выявлены представители семейств *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, рода *Staphylococcus*. При этом отмечается тенденция к увеличению представленности для ряда вышеуказанных микроорганизмов в рубце животных в течение онтогенеза.

Так, содержание возбудителей гнойно-некротических инфекций (род *Staphylococcus*) и бактерий, традиционно связываемых с развитием гастроэнтеритов (семейств *Enterobacteriaceae* и *Burkholderiaceae*), было наименьшим у 4-месячных телят ($P < 0,05$). При этом представленность возбудителей кампилобактериоза (семейства *Campylobacteriaceae*) и некробактериоза (филум *Fusobacteria*), была высокой и у телят, и у взрослых особей северных оленей ($P < 0,05$). Доля же возбудителей актиномикозов филума *Actinobacteria* (семейств *Corynebacterium*, *Coriobacteriaceae*) была наиболее высокой у молодняка ($P < 0,05$).

Выводы. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии значимых возрастных изменений микробиоты рубца *Rangifer tarandus*. В составе бактериального сообщества рубца северных оленей выявлен ряд отличий от других жвачных, что может объясняться физиологическими особенностями этих уникальных животных

и их приспособленностью к условиям обитания в Арктических регионах. В целом, полученные результаты свидетельствуют о расширении таксономического разнообразия микроорганизмов в течение онтогенеза, сопровождающегося постепенным заселением рубца новыми микроорганизмами.

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. Hungate R. E. The Rumen and its Microbes. New York: Academic Press, 1966.
2. Church D. C. Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition. New Jersey: Prentice Hall, 1993.
3. Тараканов Б. В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. М.: Научный мир, 2006. 188 с.
4. Jami E. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals / E. Jami, I. Mizrahi // PLoS ONE. — 2012. — V. 7 (3). — e33306.
5. Veneman J. B. does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows? / J. B. Veneman, S. Muetzel, K. J. Hart, C. L. Faulkner, J. M. Moorby, H. B. Perdok // PLoS ONE. — 2015. — V. 10 (10). — e0140282.
6. Snelling T. J. diversity and community composition of methanogenic archaea in the rumen of scottish upland sheep assessed by different methods / T. J. Snelling, B. Genz, N. McKain, M. Watson, S. M. Waters, C. J. Creevey et al. // PLoS ONE. — 2014. — V. 9(9). — e106491.
7. de la Fuente G. Pros and cons of Ion-Torrent next generation sequencing versus Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community / G. de la Fuente, A. Belanche, S. E. Girwood, E. Pinloche, T. Wilkinson, C. J. Newbold // PLoS ONE. — 2014. — V. 9 (7). — e101435.
8. Salgado-Flores A. Rumen and cecum microbiomes in Reindeer (Rangifer tarandus) are changed in response to a lichen diet and may affect enteric methane emissions / A. Salgado-Flores, L. H. Hagen, S. L. Ishaq, M. Zamanzadeh, A-DG. Wright, P. B. Pope // PLoS ONE. — 2016. — V. 11 (5). — e0155213.
9. Han X. Rumen Bacterial Diversity of 80 to 110-day-old goats using 16S rRNA sequencing / X. Han, Y. Yang, H. Yan, X. Wang, L. Qu, Y. Chen // PLoS ONE. — 2015. — V. 10(2). — e0117811.
10. Wang L. Exploring the goat rumen microbiome from seven days to two years / L. Wang, Q. Xu, F. Kong, Y. Yang, D. Wu, S. Mishra // PLoS ONE. — 2016. — V. — 11(5). — e0154354.
11. Лаптев Г. Ю., Новикова Н. И., Ильина Л. А., Ёылдырым Е. А., Нагорнова К. В., Думова В. А., Солдатова В. В., Большаков В. Н., Горфункель Е. П., Дубровина Е. Г., Соколова О. Н., Никонов И. Н., Лебедев А. А. Нормы содержания микрофлоры в рубце крупного рогатого скота. Методические рекомендации. СПб: БИОТРОФ, 2016. 48 с.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
13. Самандас А. М. Современная эпизоотическая ситуация по некробактериозу северных оленей на Таймыре / А. М. Самандас, К. А. Лайшев, С. Г. Самойлов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. — 2011. — № 5–6. — С. 92–96.
14. Sundset M. A. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer / M. A. Sundset, K. E. Præsteng, I. K. O. Cann, S. D. Mathiesen, R. I. Mackie // Microbial. Ecol. — 2007. — V. 54. — P. 424–438.
15. Sundset M. A. Eubacterium rangiferina, a novel usnic acid-resistant bacterium from the reindeer rumen / M. A. Sundset, A. Kohn, S. D. Mathiesen, K. E. Præsteng // Naturwissenschaften. — 2008. — V. 95. — P. — 741–749.
16. Тараканов Б. В. Целлюлозолитическая микрофлора и метаболические функции в рубце молодняка крупного рогатого скота при раннем включении в рацион растительных кормов / Б. В. Тараканов, Т. А. Николичева // Сельскохозяйственная биология. — 1986. — №4. — С. 89–94.
17. Nocek J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis / J. E. Nocek // J. Dairy Sci. — 1997. — V. 80. — P. 1005–1028.

L. A. Ilina¹, G. Yu. Laptev¹, E. A. Yildyrym, T. P. Dunyashev¹, A. V. Dubrowin¹, K. A. Laishev²

Age differences of reindeer rumen bacterial composition in Russian Arctic

Abstract. *Reindeer husbandry is a strategically important industry providing the population of Russian Arctic regions with food. An important role in the life of Rangifer tarandus is played by ruminal microorganisms-symbionts, which enable animals to effectively use scarce nutrient resources of the tundra and forest-tundra. However, the reindeer ruminal microbial community and its age-related changes are the least studied among other ruminants.*

In this study, the comparative analysis results of rumen bacterial community composition of calf (4 months), young (1–2 years) and adults (3–6 years) Rangifer tarandus of the Russian Arctic are presented for the first time. Samples of ruminal contents were selected in the summer-autumn period in 2017 from three animals of each age group in the Yamal-Nenets Autonomous District. The reindeer ruminal bacterial community composition was analyzed in the laboratory of the «BIOTROF+» Ltd. by T-RFLP method.

In the ontogenesis, significant changes in the microorganisms' representation were noticed, the greatest of which was noted in microorganism involved to carbohydrates fermentation. The content of cellulolytic bacteria of the Clostridia class and the acid-utilizing species of the Negativicutes class ($P < 0.05$) decreased with age, bacteria with the amylo- and cellulosolytic properties of the phylum Bacteroidetes increased ($P < 0.05$).

A wide range of microorganisms, which traditionally belong to the pathogens of various animals' and humans' diseases was revealed. With age, a tendency to increase the number of pathogens, including the bacteria of the families Campylobacteraceae, Burkholderiaceae, phylum Fusobacteria, and the genus Staphylococcus was noticed. The greatest percent of opportunistic microorganisms, including of phylum Actinobacteria and the family Enterobacteriaceae, was detected in young animals.

Key words: reindeer, Rangifer tarandus, rumen bacterial community, molecular-genetic methods, T-RFLP-analysis, ontogeny, summer-autumn period, Russian Arctic regions.

Authors:

Ilina L. A. — PhD (Biol. Sci.), Head of the Molecular-genetic laboratory; e-mail: ilina@biotrof.ru;

Laptev G. Y. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), director, «BIOTROF+» Ltd, Russia; e-mail: georg-laptev@rambler.ru;

Yildyrym E. A. — PhD (Biol. Sci.), biotechnologist; e-mail: deniz@biotrof.ru;

Dunyashev T. P. — postgraduate student, biotechnologist; e-mail: timur@biotrof.ru;

Dubrowin A. V. — postgraduate student, biotechnologist; e-mail: dubrowin.a.v@yandex.ru;

Laishev K. A. — Dr. Habil. (Vet. Sci.), professor, corresponding member of the Russian Academy of Sciences; e-mail: layshev@mail.ru.

¹ «BIOTROF+» Ltd, Russia, 192284, St. Petersburg, Zagrebysky b., 19, bldg. 1, ap. 13;

² FGBNU Northwest Center for Interdisciplinary Research of food supply problems, Russia, 196608, St. Petersburg — Pushkin, highway Podbelskogo, 7.

References

1. Hungate R. E. The Rumen and its Microbes. New York: Academic Press, 1966.
2. Church D. C. Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition. New Jersey: Prentice Hall, 1993.
3. Tarakanov B. V. Methods for studying of agricultural animals and poultry digestive tract microflora. M.: Nauchnyj mir, 2006. 188 p.
4. Jami E. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals / E. Jami, I. Mizrahi // PLoS ONE. — 2012. — V. 7 (3). — e33306.
5. Veneman J. B. does dietary mitigation of enteric methane production affect rumen function and animal productivity in dairy cows? / J. B. Veneman, S. Muetzel, K. J. Hart, C. L. Faulkner, J. M. Moorby, H. B. Perdok // PLoS ONE. — 2015. — V. 10 (10). — e0140282.

6. Snelling T. J. diversity and community composition of methanogenic archaea in the rumen of scottish upland sheep assessed by different methods / T. J. Snelling, B. Genз, N. McKain, M. Watson, S. M. Waters, C. J. Creevey et al. // PLoS ONE. — 2014. — V. 9 (9). — e106491.
7. de la Fuente G. Pros and cons of Ion-Torrent next generation sequencing versus Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community / G. de la Fuente, A. Belanche, S. E. Girwood, E. Pinloche, T. Wilkinson, C. J. Newbold // PLoS ONE. — 2014. — V. 9 (7). — e101435.
8. Salgado-Flores A. Rumen and cecum microbiomes in Reindeer (*Rangifer tarandus*) are changed in response to a lichen diet and may affect enteric methane emissions / A. Salgado-Flores, L. H. Hagen, S. L. Ishaq, M. Zamanzadeh, A-DG. Wright, P. B. Pope // PLoS ONE. — 2016. — V. 11 (5). — e0155213.
9. Han X. Rumen Bacterial Diversity of 80 to 110-day-old goats using 16S rRNA sequencing / X. Han, Y. Yang, H. Yan, X. Wang, L. Qu, Y. Chen // PLoS ONE. — 2015. — V. 10 (2). — e0117811.
10. Wang L. Exploring the goat rumen microbiome from seven days to two years / L. Wang, Q. Xu, F. Kong, Y. Yang, D. Wu, S. Mishra // PLoS ONE. — 2016. — V. 11 (5). — e0154354.
11. Laptev G. Ju., Novikova N. I., Il'ina L. A., Jyldyrym 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. Norms of microflora in rumen of cattle. Metodicheskie rekomendacii. SPb: BIOTROF, 2016. 48 p.
12. Maniatis T., Fritch Je., Sjembruk Dzh. Molecular cloning. M.: Mir, 1984. 480 p.
13. Samandas A. M. The modern epizootic situation of necrobacteriosis of reindeers in Taimyr / A. M. Samandas, K. A. Lajshev, S. G. Samojlov // Sibirskij vestnik sel'skhozajstvennoj nauki. — 2011. — № 5–6. — P. 92–96.
14. Sundset M. A. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer / M. A. Sundset, K. E. Præsteng, I. K. O. Cann, S. D. Mathiesen, R. I. Mackie // Microbial. Ecol. — 2007. — V. 54. — P. 424–438.
15. Sundset M. A. *Eubacterium rangiferina*, a novel usnic acid-resistant bacterium from the reindeer rumen / M. A. Sundset, A. Kohn, S. D. Mathiesen, K. E. Præsteng // Naturwissenschaften. — 2008. — V. 95. — P. — 741–749.
16. Tarakanov B. V. Cellulosolytic microflora and metabolic functions in the rumen of young cattle with early inclusion in the diet of plant feeds / B. V. Tarakanov, T. A. Nikolicheva // Sel'skhozajstvennaja biologija. — 1986. — № 4. — P. 89–94.
17. Nocek J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis / J. E. Nocek // J. Dairy Sci. — 1997. — V. 80. — P. 1005–1028.