



УДК 579.62:612.32-07:636.294(985)
DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.2.127

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА NGS ДЛЯ ОЦЕНКИ СИМБИОТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ РОССИЙСКОЙ АРКТИКИ

Ильина Л.А.¹, к.б.н., Филиппова В.А.¹, Йылдырым Е.А.¹, Дубровин А.В.¹, Дуняшев Т.П.¹,
Соболев Д.В.¹, Лайшев К.А.²

¹ООО «БИОТРОФ+»

²ФГБУ Северо-Западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения

Ключевые слова: NGS, рубец, Rangifer tarandus, микрофлора, Арктика

Keywords: NGS, Rumen, Rangifer tarandus, microflora, Arctic



РЕФЕРАТ

Метод высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing (NGS)) позволяет глубоко анализировать состав микроорганизмов рубца жвачных животных. Отбор образцов содержимого рубца осуществляли в зимне-весенний период в период забоя северных оленей на территории Мурманской области - в СХПК «Тундра» Ловозерского района. Всего было отобрано 12 образцов рубцовой жидкости. Образцы содержимого рубца, предназначенные для молекулярно-генетических исследований, сразу после отбора были заморожены при температуре -20°C, а затем помещены на длительное хранение в морозильную камеру. Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc. Литва»), в соответствии с рекомендациями производителя. Количество выделенной ДНК измеряли при помощи флуорометра Qubit® 2.0 (Life Technologies, США). Выделенную тотальную ДНК для дальнейшего анализа хранили при температуре -20°C.

Оценку бактериального сообщества рубца проводили методом NGS-секвенирования на платформе для секвенирования следующего поколения MiSeq (Illumina, США) с применением праймеров для 16S рРНК. Секвенирование проводили при помощи реагентов для подготовки приготовления библиотек (Illumina, США).

Обработку полученных ридов (прочтений ДНК), включающая перекрытие, фильтрацию по качеству (Q30), триммирование праймеров проводили с помощью биоинформатической платформы Illumina. Контроль качества и анализ данных проводился в соответствии с программой QIIME2 ver.2019.10 (<https://docs.qiime2.org>).

NGS образцов рубцового содержимого северных оленей Мурманской области позволил описать закономерности бактериального биоразнообразия микробного сообщества рубца северных оленей и выявить ряд патогенных групп бактерий. Таким образом, использование метода NGS для анализа микробных сообществ рубца северного оленя представляется интересным для выявления различных патогенов и характеристики состояния пищеварительной системы и здоровья животного в целом.

ВВЕДЕНИЕ

Жвачные - это животные, обладающие особым строением желудочно-кишечного тракта, приспособленного для переваривания большого количества клетчатки. Среди всех жвачных животных особенно выделяются северные олени – уникальные животные, обладающие адаптивными приспособлениями, которые помогают им успешно выживать в условиях Крайнего Севера [5]. В составе пищеварительной системы жвачных животных есть рубец – орган, населенный большим количеством микроорганизмов, обеспечивающих переваривание клетчатки. Таким образом, это симбиоз, сформировавшийся за длительный период коэволюции. Изменения в его составе могут приводить к болезням животных. Например, ацидозом, в основе которого лежит увеличение производства молочной кислоты молочно-кислыми бактериями и, как следствие, невозможность нормально переваривать клетчатку. По современным оценкам, разнообразие микроорганизмов в рубце жвачных достигает нескольких тысяч видов, детально изученными среди которых является менее 100. Большинство среди них являются строго анаэробными некультивируемыми видами [2].

Поэтому исследования микрофлоры рубца северных оленей может способствовать, во-первых, пониманию адаптационных возможностей этих животных, а, во-вторых, создавать предпосылки для использования этих знаний для улучшения процессов переваривания пищи у крупного рогатого скота. В настоящее время, с появлением новых молекулярно-биологических методов, открываются широкие возможности для более глубокого понимания этих процессов. Метод высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing (NGS)) позволяет глубоко анализировать состав микроорганизмов рубца жвачных животных. Он успешно применяется вот уже в течение нескольких лет для подобных исследований [3]. Однако, подобных исследований, посвященных микробиоте рубца северных оленей не так много, особенно

это касается северных оленей, обитающих на территории Российской Арктики крайне мало [1, 5]. Изучение сложных симбиотических сообществ рубца северного оленя остается одной из наиболее интересных тем микробной экологии в связи с возможностью расширения представлений об адаптационных физиологических приспособлениях северных оленей, позволяющих им использовать для питания скудные питательные ресурсы тундры и лесотундры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов содержимого рубца осуществляли в зимне-весенний период в период забоя северных оленей на территории Мурманской области - в СХПК «Тундра» Ловозерского района. Всего было отобрано 12 образцов рубцовой жидкости. Образцы содержимого рубца, предназначенные для молекулярно-генетических исследований, сразу после отбора были заморожены при температуре -20°C, а затем помещены на длительное хранение в морозильную камеру. Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc. Литва», в соответствии с рекомендациями производителя. Количество выделенной ДНК измеряли при помощи флуорометра Qubit® 2.0 (Life Technologies, США). Выделенную тотальную ДНК для дальнейшего анализа хранили при температуре -20°C.

Оценку бактериального сообщества рубца проводили методом NGS-секвенирования на платформе для секвенирования следующего поколения MiSeq (Illumina, США) с применением праймеров для 16S рРНК. Секвенирование проводили при помощи реагентов для подготовки приготовления библиотек (Illumina, США).

Обработку полученных ридов, включающая перекрывание, фильтрацию по качеству (Q30), триммирование праймеров проводили с помощью биоинформатической платформы Illumina. Контроль качества и анализ данных проводился в соответствии с программой QIIME2 ver.2019.10 (<https://docs.qiime2.org>).

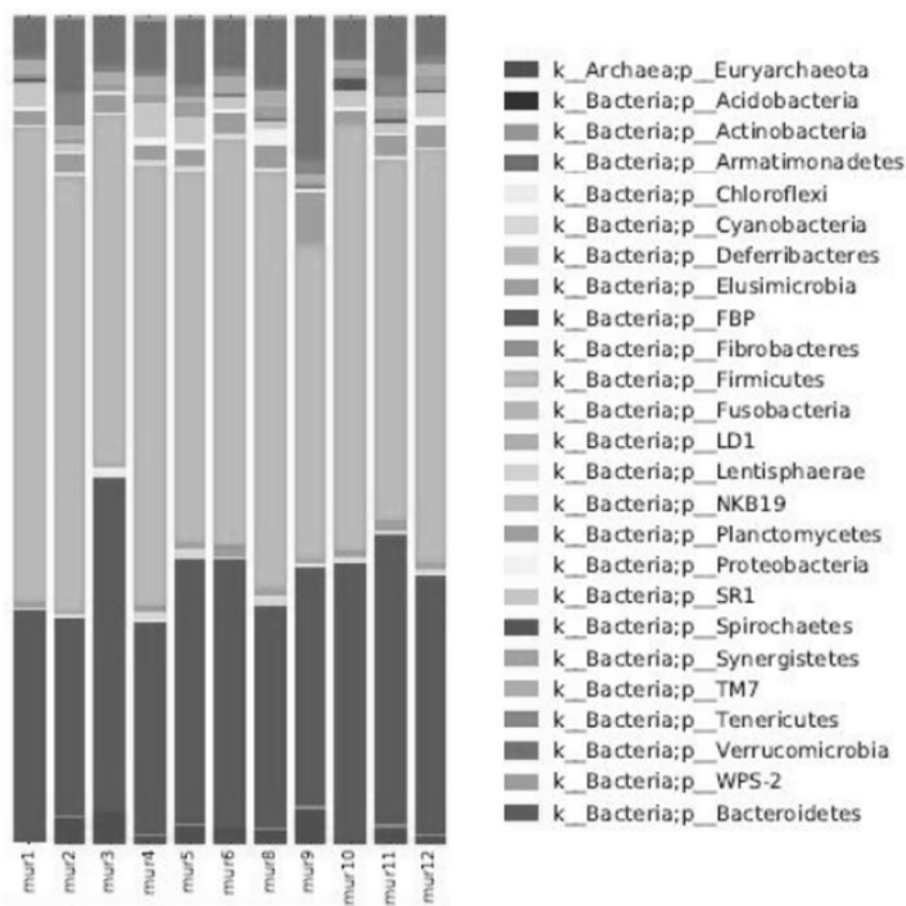


Рис. 1. Филогенетическая структура микробного сообщества рубца северного оленя на уровне филы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее количество проанализированных последовательностей методом NGS-секвенирования в среднем составило 27715 на образец. При таксономическом анализе последовательностей в образцах выявлены представители 300 родов бактерий. Количество идентифицированных ОТЕ (таксономических единиц) составило 400-700.

При анализе таксономической принадлежности бактерий значительное количество последовательностей не удалось идентифицировать до уровня филы (16,29-28,61 %), что свидетельствует о наличии в рубце северных оленей абсолютно неиз-

вестных микроорганизмов, нуклеотидные последовательности которых не имеют аналогов с описанными филами. Неидентифицированные последовательности были выявлены и на более низких таксономических уровнях

Всего в бактериальном сообществе выявлены представители 27 филумов, включая 25 - бактериальных, 2 - археотных (рис. 1). Суммарная доля бактерий фил *Firmicutes* и *Bacteroidetes* составила в бактериальном сообществе содержимого рубца от 81,4 до 91,4%, *Proteobacteria* – не более 6%, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* – не более 3%, остальных – в минорном количестве.

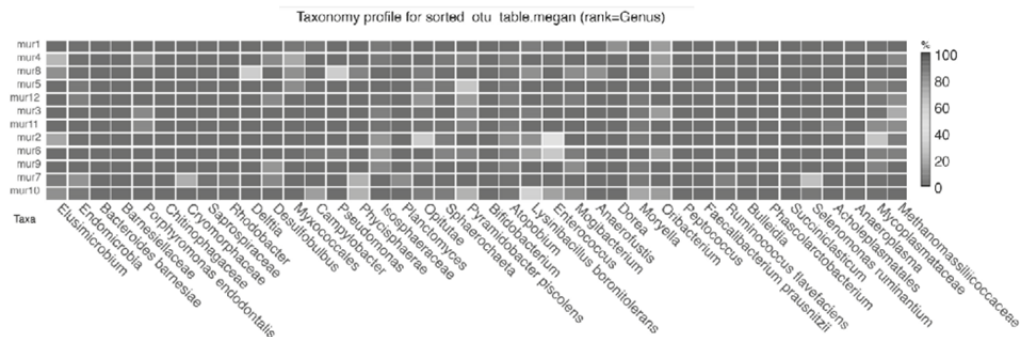


Рис. 2. Филогенетическая структура микробного сообщества рубца северного оленя на уровне рода.

Среди бактерий, населяющих рубец северного оленя были выявлены такие бактерии, как *Selenomonas ruminantium*, *Bacteroides barnesi*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Pyramidobacter piscolens*, *Ruminococcus flavifaciens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaeroplasmata sp.*, *Succinibacterium sp.*, семейства *Chitinophagaceae* и пр. (Рис.2). Все эти бактерии можно назвать типичными представителями рубца жвачных животных. Так, например, кислот-утилизирующих бактерии родов *Succinibacterium* и *Selenomonas* позволяют поддерживать в рубце необходимый уровень кислотности за счет способности утилизировать образующиеся в результате сбраживания моносахаров, олиго- и полисахаридов кислоты (включая уксусную, пропионовую, масляную, молочную и другие) [4].

В бактериальном сообществе рубца *Rangifer tarandus* в минорных количествах детектированы различные условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, в т.ч. *Porphyromonas endodontalis*, представители семейств *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Porphyromonas endodontalis*, *Mycoplasmataceae*, фило *Fusobacteria*. Это представляется также интересным, поскольку вопрос о присутствии и распространении в рубце *Rangifer tarandus* возбудителей инфекционных заболеваний изучен слабо.

ВЫВОДЫ

Результаты показали, что доминирующее положение в микробных сообще-

ствах, как и у других жвачных, занимали представители фил *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, общее содержание которых между образцами достоверно не различалось. Был выявлен ряд патогенных групп бактерий, таких как, *Porphyromonas endodontalis*, представителей семейств *Campylobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Porphyromonas endodontalis*, *Mycoplasmataceae*, фило *Fusobacteria*. Таким образом, использование метода NGS для анализа микробных сообществ рубца северного оленя представляется интересным для выявления различных патогенов и характеристики состояния пищеварительной системы и здоровья животного в целом.

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».

APPLICATION OF NGS FOR EVALUATING THE SYMBIOTIC MICROFLORA OF THE REINDEER RUMEN IN THE RUSSIAN ARCTIC. Ilyina L.A.¹, Ph.D., Filippova V.A.¹, Yildirim E.A.¹, Dubrovina A.V.¹, Dunyashev T.P.¹, Sobolev D.V.¹, Layshev K. A.²

¹ООО "BIOTROF +", ²FSBI North-West Center for Interdisciplinary Studies of Food Security Problems

ABSTRACT

The method of next generation sequencing (NGS) allows deeply analyze the composition of the microorganisms of the rumen of ruminants. Sampling of the contents of the rumen was carried out in the winter-spring period during the slaughter of reindeer in the territory of the Murmansk region - in the agricultural complex "Tundra" of the Lovozero district. 12 samples of rumen content were taken. Samples of rumen contents intended for molecular genetic studies were frozen immediately after selection at -20 ° C and then placed for long-term storage in a freezer. Total DNA was extracted from the samples using the Genomic DNA Purification Kit (Fermentas Inc., Lithuania), in accordance with the manufacturer's recommendations. The amount of DNA extracted was measured using a Qubit® 2.0 fluorometer (Life Technologies, USA). The extracted total DNA was stored at -20 ° C for further analysis.

Evaluation of the bacterial community of the rumen was carried out by NGS sequencing on the next generation sequencing platform MiSeq (Illumina, USA) using primers for 16S rRNA. Sequencing was carried out using reagents for library preparation (Illumina, USA).

The processing of the reads (readings of DNA), including overlapping, quality filtration (Q30), and primer trimming, were performed using the Illumina bioinformatics platform. Quality control and data analysis was carried out in accordance with the QIIME2 ver.2019.10 program (<https://docs.qiime2.org>).

NGS samples of rumen content of reindeer in the Murmansk region made it possible to describe the bacterial biodiversity patterns of the microbial community of the reindeer rumen and to reveal a number of pathogenic groups of bacteria. Thus, the use of the NGS method for the analysis of the microbial communities of the reindeer rumen is interesting for identifying various pathogens and characterizing the digestive system and the health of the animal as a whole.

ЛИТЕРАТУРА

Aagnes, T.H. Ruminal microbial digestion in free living, in captive lichen-fed and in starved reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in winter / T.H. Aagnes, W. Sørmo, S.D. Mathiesen // *Applied Environmental Microbiology*. – 1995. – Vol. 61, №2. – P.583-591.
Jami, E. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals / E. Jami, I. Mizrahi // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, №3. – e33306.

Nocek, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis / J.E. Nocek // *Journal Dairy Science*. – 1997. – Vol. 80. – P.1005-1028.

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 Ecology*. – 2007. – Vol. 54, №3. – P.424–438.

Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range / G. Henderson, F. Cox, S.Ganesh [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P.14567.