УДК 597.553.2:591.132/.434

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ КИШЕЧНИКА ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБ С РАЗНЫМИ ПИЩЕВЫМИ СТРАТЕГИЯМИ

[1]Дзюба Е.В., [1]Суханова Е.В., [1]Деникина Н.Н., [1,2]Белькова Н.Л.

[1]ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения РАН, Иркутск, e-mail: e_dzuba@lin.irk.ru;

[2]ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», Иркутск

Значительное влияние на состав бактериального сообщества кишечника рыб оказывают вид и биохимические характеристики кормовых объектов, следовательно, качественный и количественный состав микробиоценоза рыб с различным типом питания отличается. Всеядные виды рыб обладают большим микробным разнообразием, чем хищные. Байкальский омуль *Coregonus migratorius* и черный байкальский хариус *Thymallus baicalensis* отличаются по пищевым стратегиям и принадлежат к разным трофическим сетям озера Байкал. Цель исследования – сопоставить генетическое разнообразие микробиоценозов кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса и байкальского омуля. Материалом для работы послужили черный байкальский хариус и байкальский омуль. Молекулярно-генетический анализ фрагментов кишечника рыб проводили согласно адаптированным ранее методикам. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ FASTA. В составе кишечных микробиоценозов рыб определены аллохтонные (строгие аэробы, представители филы Proteobacteria: *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas*, *Collimonas, Pseudomonas, Pseudoalteromonas, Quatrionicoccus, Stenotrophomonas,* некультивируемые бактерии фил Bacteroidetes и Actinobacteria) и автохтонные представители (микроаэрофилы и анаэробы: *Acinetobacter, Aeromonas, Brevinema, Caulobacter*, *Clostridium, Deefgea, Delftia, Enterobacter*, *Escherichia, Flavobacterium, Mycoplasma, Plesiomonas, Pseudomonas, Salmonella, Spironema, Sphingomonas* и некультивируемые Deltaproteobacteria). Пищевые спектры рыб достаточно широки, но качественный состав кормовых объектов, составляющих основу их питания, различен. Черный байкальский хариус показал большее генетическое разнообразие кишечной микрофлоры, чем байкальский омуль.

Ключевые слова: микробиоценоз, генетическое разнообразие, Thymallus baicalensis, Coregonus migratorius, пищевые стратегии

COMPARATIVE ANALYSIS OF GUT MICROBIOCENOSES OF SALMONID FISH WITH DIFFERING FEEDING STRATEGIES

[1]Dzyuba E.V., [1]Sukhanova E.V., [1]Denikina N.N., [1,2]Belkova N.L.

[1]Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, e-mail: e_dzuba@lin.irk.ru;

[2]Irkutsk State University, Irkutsk

Species and biochemical characteristics of nutrition affect significantly the composition of bacterial communities in the fish intestine. Therefore, qualitative and quantitative composition of microbiocenoses differs in fish with different feeding strategies. Omnivorous fish possess a higher microbial diversity than predators. Baikal omul *Coregonus migratorius* and Baikal black grayling *Thymallus baicalensis* have different feeding strategies and they belong to different food-webs of Lake Baikal. The aim of this study was to compare genetic diversity of microbiocenoses of intestinal microbiota in Baikal black grayling and Baikal omul. Baikal black grayling and Baikal omul were studied. Intestine fragments of fish were analysed using molecular-genetic methods adapted previously. The web site FASTA was used for comparative analysis of the sequences obtained. Intestine microbiocenoses of fish contained allochthonous (strict aerobes of the phylum Proteobacteria: *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas*, *Collimonas, Pseudomonas, Pseudoalteromonas, Quatrionicoccus, Stenotrophomonas* and uncultured bacteria of the phyla Bacteroidetes and Actinobacteria) and autochthonous representatives (microaerophiles and anaerobes: *Acinetobacter, Aeromonas, Brevinema, Caulobacter*, *Clostridium, Deefgea, Delftia, Enterobacter*, *Escherichia, Flavobacterium, Mycoplasma, Plesiomonas, Pseudomonas, Salmonella, Spironema, Sphingomonas* and uncultured Deltaproteobacteria). Food spectrums of fish significantly varied, and the qualitative content of preys that comprised the basis for fish feeding was different. Genetic diversity of the intestinal flora was higher in Baikal black grayling than in Baikal omul.

Keywords: microbiocenoses, genetic diversity, Thymallus baicalensis, Coregonus migratorius, feeding strategies

Значительное влияние на микробиоценоз кишечника рыб оказывают вид и биохимические характеристики кормовых объектов [10], в связи с этим качественный и количественный состав составляющих его микроорганизмов различен у рыб с различным типом питания [4]. Всеядные виды рыб обладают большим микробным разнообразием, чем хищные [12].

Байкальский омуль *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) и черный байкальский хариус *Thymallus baicalensis* отличаются по пищевым стратегиям и принадлежат к разным (пелагической и бентической) трофическим сетям озера Байкал. Известны три морфоэкологические группы (МЭГ) байкальского омуля (пелагическая, прибрежная и придонно-глубоководная),

занимающие различные пищевые ниши. В зимне-весенний период омуль всех МЭГ имеет сходные пищевые спектры (*Epischura baicalensis* и *Macrohectopus branickii*, молодь рыб, донные амфиподы), т.к. обитает в придонных слоях склоновой зоны озера. В мае-июне омуль расходится по различным биотопам: придонно-глубоководный остается в придонных слоях воды на значительных глубинах (сезонные изменения рациона не выражены); пелагический нагуливается в пелагиали и в придонных слоях воды (сезонные изменения незначительны); омуль прибрежной МЭГ обитает в прибрежной зоне озера (кормовая база крайне изменчива сезонно и территориально) [11].

Черный байкальский хариус преимущественно ведет образ жизни, связанный с речными условиями. В течение всего года он образует плотные скопления в литорали Байкала в предустьевых участках притоков, в которых происходит его нерест и частично нагул [3]. По характеру питания черного байкальского хариуса можно считать эврифагом, т.к. спектр потребляемых им организмов очень широк и включает в себя как животных бентоса (личинок ручейников, амфипод, гастропод и др.), так и имаго амфибиотических насекомых [6, 7].

Цель настоящего исследования – провести сравнительный анализ генетического разнообразия кишечных микробиоценозов черного байкальского хариуса и байкальского омуля, лососевидных рыб с разной пищевой стратегией и распределением в озере.

Материал и методы исследования

Материалом для работы послужили два вида лососевидных рыб озера Байкал: черный байкальский хариус (27 экз.) и байкальский омуль (67 экз.). Сборы материалов по акватории озера Байкал проводили в период открытой воды (июнь и сентябрь) разноглубинным тралом РК-15/30. Для сбора черного байкальского хариуса использовали жаберные сети (ячея 14–24 мм), которые выставлялись на глубинах 0,5–8,0 м в мае 2008 г. в районе б. Песчаная (южная котловина озера Байкал). Непосредственно после отлова в лабораторных условиях взяты фрагменты кишечного тракта (КТ) рыб.

Молекулярно-генетический анализ проводили согласно адаптированным ранее методикам [2]. Структуру микробных сообществ кишечной микробиоты байкальского омуля трех МЭГ и черного байкальского хариуса исследовали с помощью групп-специфичной ПЦР [1]. Ампликоны, полученные индивидуально для каждой особи на консервативных бактериальных праймерах [2], объединяли для анализируемых групп и суммарные образцы, лигировали с использованием набора GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва). Все выросшие колонии анализировали методом ПЦР с праймерами, рекомендованными производителем (Fermentas, Литва). Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Полученные последовательности проанализировали с помощью пакета программ FASTA (http://www.ebi.ac.uk/fasta33/), на наличие химерных структур проверили программой CHECK CHIMERA (http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera) и зарегистрировали в международной EMBL-базе данных под номерами: FR799652, FR799653, FR799680, FR799684, HE565982–HE566014, HE566026–HE566038, HE566041–HE566044, HE584724–HE584729, HE589594–HE589602.

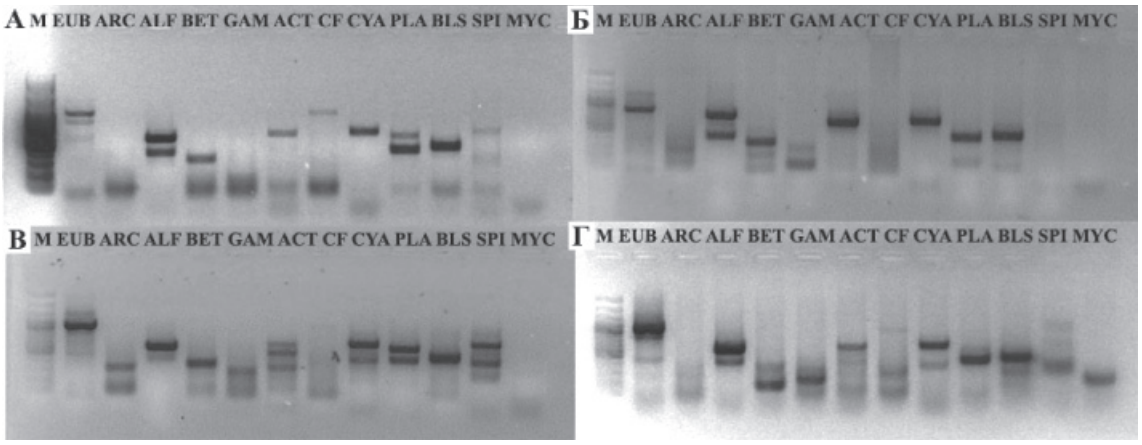
Результаты исследования и их обсуждение

Кишечная микробиота рыб, включающая аэробных, факультативно-анаэробных и облигатных анаэробных бактерий, может быть классифицирована как автохтонная, или собственная (микроорганизмы, колонизирующие эпителий кишечника хозяина), и аллохтонная, или транзиторная. Состав и структура микробного сообщества зависят от экологических условий местообитания и пищевых стратегий рыб.

Сравнительный анализ микробного разнообразия на уровне крупных таксонов: домены Bacteria (EUB) и Archaea (ARC); филы Actinobacteria (ACT), Bacteroidetes (CF), Planctomycetes (PLA), Firmicutes (BLS), Cyanobacteria (CYA) и Spirochaetes (SPI), а также классы филы Proteobacteria: Alpha (ALF), Beta (BET) и Gamma (GAM) с помощью групп-специфичной амплификации не выявил отличий в структуре микробных сообществ кишечной микробиоты омуля трех МЭГ в весенний период. Типичная электрофореграмма приведена на рисунке А. В осенний период у омуля пелагической МЭГ сохраняется такой же широкий спектр таксонов, в то время как у омуля придонно-глубоководной МЭГ разнообразие ниже; не были детектированы представители фил Spirochaetes и Bacteroidetes (рисунок, Б). Таксономический состав микробиоты омуля прибрежной МЭГ осенью сохраняется с перераспределением доминант: значительно уменьшается представленность всех классов протеобактерий, при этом увеличивается количество Spirochaetes (рисунок, В).

Спектр таксономических групп кишечной микробиоты черного байкальского хариуса совпадает с таковым у прибрежного омуля в осенний период, дополнительно у хариуса детектируется байкальский генотип *Mycoplasma* (рисунок, Г).

Присутствие спирохет и микоплазм в кишечнике рыб может зависеть от типа питания рыб в целом. Микоплазмы и спирохеты отмечены у моллюсков [13]. В пищевом спектре черного байкальского хариуса моллюски являются одним из постоянных компонентов пищи [5]. В питании байкальского омуля моллюски встречаются реже, в основном у рыб, принадлежащих к прибрежной МЭГ.



Электрофореграмма ампликонов с суммарной ДНК, выделенной из кишечника байкальского омуля в весенний (А) и осенний (Б, В) периоды, и черного байкальского хариуса (Г) на групп-специфичных праймерах:
EUB – домен Bacteria (900 п.н.); ARC – домен Archaea (600 п.н.); ALF – класс Alphaproteobacteria (400 п.н.); BET – класс Betaproteobacteria (350 п.н.); GAM – класс Gammaproteobacteria (150 п.н.); ACT – фила Actinobacteria (640 п.н.); CF – фила Bacteroidetes (1050 п.н.); CYA – фила Cyanobacteria (650 п.н.); PLA – фила Planctomycetes (420 п.н.); BLS – фила Firmicutes (400 п.н.); SPI – фила Spirochaetes (350 п.н.); Myc – байкальский генотип Mycoplasma (150 п.н.); M – маркер молекулярного веса

Микроорганизмы в ассоциациях, в том числе в составе кишечной микробиоты, формируют устойчивые сообщества, способные существовать неопределенно долго за счет поступающей извне энергии и биогенных элементов. Переход макроорганизма на другой тип питания сопровождается появлением новых пищевых компонентов и, как следствие, изменением разнообразия микроорганизмов, это подтверждается результатами анализа микробиоты КТ осенних популяций омуля прибрежной и придонно-глубоководной МЭГ. Пищевые спектры рыб достаточно широки, но качественный состав кормовых объектов, составляющих основу их питания, различен. Различия в составе микробных ассоциаций также отмечены и на уровне таксонов более низкого уровня – родовой принадлежности отдельных представителей как аллохтонной, так и автохтонной микробиоты (таблица). Для черного байкальского хариуса среди представителей классов Gamma и Betaproteobacteria определены последовательности, имеющие высокую гомологию с таковыми из кишечной микробиоты байкальского омуля.

Сравнительный анализ кишечных микробиоценозов черного байкальского хариуса и байкальского омуля

Черный байкальский хариус	Байкальский омуль
Аллохтонные микроорганизмы	
Azospirillum, *Bradyrhizobium*, *Comamonas*, *Collimonas, Pseudomonas, Stenotrophomonas*	*Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Comamonas, Quatrionicoccus, Stenotrophomonas,* некультивируемые бактерии сем. Chitinophagaceae и Rubrobacteraceae
Автохтонный микробиоценоз	
Acinetobacter, Aeromonas, Brevinema, Caulobacter, *Clostridium, Deefgea, Delftia, Enterobacter*, *Escherichia, Flavobacterium, Mycoplasma, Plesiomonas, Pseudomonas, Salmonella, Spironema, Spironucleus barkhanus*, *Sphingomonas*, некультивируемая Deltaproteobacteria	Enterobacter, Pseudomonas, Salmonella

Наличие представителей родов *Comamonas*, *Stenotrophomonas* и *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp., *P. putida*, *P. stutzeri, P. reactans* и *P. rhodesiae*) может быть связано с их присутствием в байкальской воде или в ассоциациях с общими

для черного байкальского хариуса и байкальского омуля кормовыми объектами. Также к аллохтонной микробиоте следует отнести некоторых представителей класса Alphaproteobacteria, детектированных в кишечнике черного байкальского хариуса: их ближайшие родственники выделены из ассоциаций с растениями (*Bradyrhizobium* sp.) и из пресных вод (*Azospirillum* sp.).

В то же время в составе кишечного микробиоценоза у черного байкальского хариуса определены ближайшие родственники *Caulobacter* sp. и *Sphingomonas* sp. (класс Alphaproteobacteria), которые имеют высокую гомологию с некультивируемыми бактериями, выделенными из кишечной микробиоты различных организмов. Так, среди их ближайших гомологов следует отметить некультивируемые бактерии, идентифицированные в кишечнике амура (FR853581), *Tamarixia radiata* (EF433789) и *Sphenophorus levis* (FJ626264), симбионтов *Nilaparvata lugens* (FJ774970), китайского краба *Eriocheir sinensis* (DQ856499), анчоуса (DQ860013) и антарктических рыб [12]. Несомненно, данные микроорганизмы можно отнести к автохтонной микробиоте байкальских рыб. Представитель рода *Delftia* (HM587796) (класс Betaproteobacteria, сем. Comamonadaceae) идентифицирован в кишечнике термитов, другие представители этого рода, *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris,* способны разрушать пептидогликан и проявляют хитиназную активность [8]. К собственной кишечной микробиоте черного байкальского хариуса следует отнести представителей родов *Enterobacter* и *Salmonella*, последовательности которых идентичны таковым из кишечника байкальского омуля, а также *Escherichia* (класс Gammaproteobacteria, сем. Enterobacteriaceae), имеющие высокую гомологию (99 %) с микроорганизмами, культивированными из кишечника насекомых (HQ407235, HQ154567) и полученными в результате молекулярно-генетического анализа слизистой кишечника радужной форели [9].

Заключение

Таким образом, исследование структуры микробных сообществ кишечника байкальского омуля трех МЭГ и черного байкальского хариуса с помощью группспецифичной ПЦР позволило определить спектр таксонов микроорганизмов, населяющих кишечник рыб, и его сезонные изменения. При смене спектра питания увеличивается разнообразие доминирующих микроорганизмов (омуль прибрежной МЭГ), а стабильность питания ведет к формированию устойчивого микробного сообщества с уменьшением числа таксономических единиц (омуль придонно-глубоководной МЭГ). Выявлены представители аллохтонной и автохтонной микробиоты, общие и отличающиеся для разных видов рыб.

Работа выполнена в рамках проекта VI.50.1.4 «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры», № гос. рег. 01201353444.

Список литературы

1. Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоёмов России: учебно-методическое пособие. – Ярославль: Принтхаус, 2009. – С. 53–63.

2. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В., Ханаева Т.А. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами // Биология внутренних вод. – 2008. – № 2. – С. 91–94.

3. Книжин И.Б., Вайс С.Д., Сушник С. Хариусы бассейна озера Байкал (Thymallus, Thymallidae): разнообразие форм и их таксономический статус // Вопр. Ихтиологии. – 2006. – Т. 46. – № 4. – С. 442–459.

4. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. – М.: Наука, 2005. – 300 с.

5. Максимова Н.В., Дзюба Е.В. Роль моллюсков в питании черного байкальского хариуса (Thymallus arcticus baicalensis) // Четвертая Верещагинская байкальская конференция: тезисы докладов и стендовых сообщений. – Иркутск: Изд-во Ин-та географии СО РАН, 2005. – С. 119–120.

6. Тугарина П.Я., Купчинская Е.С. Питание и пищевые взаимоотношения рыб Байкало-Ангарского бассейна. – Новосибирск: Наука, 1977. – 103 с.

7. Тугарина П.Я. Хариусы Байкала. – Новосибирск: Наука, 1981. – 280 с.

8. Jørgensen N.O., Brandt K.K., Nybroe O., Hansen M. Delftia lacustris sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of Delftia tsuruhatensis as a peptidoglycan-degrading bacterium // Int J Syst Evol Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – P. 2195–2199.

9. Kim D.-H., Brunt J., Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) // J. Appl. Microbiol. – 2007. – Vol. 102. – P. 1654–1664.

10. Ringø E., Sperstad S., Myklebust R., Mayhew T.M., Olsen R.E. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (Salvelinus alpinus L.) // Aquaculture Res. – 2006. – Vol. 37. – № 9. – P. 891–897.

11. Smirnov V.V. Intraspecific structure of Baikal omul Coregonus autumnalis migratorius (Georgi) // Pol. Arch. Hydrobiol. – 1992. – Vol. 39. – № 3–4. – P. 325-333.

12. Ward N.L., Steven B., Penn K., Methé B.A., Detrich W.H. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species // Extremophiles. – 2009. – Vol. 13. – P. 679–685.

13. Wu X., Sun J., Zhang W., Wen B. Purification and antigenic characteristics of a rickettsia-like organism from the oyster Crassostrea ariakensis // Dis. Aquat. Org. – 2005. – Vol. 67. – P. 149–154.

References

1. Bel'kova N.L. Molekuljarno-geneticheskie metody analiza mikrobnyh soobshhestvV kn. Raznoobrazie mikrobnyh

soobshhestv vnutrennih vodojomov Rossii: uchebno-metodicheskoe posobie. Jaroslavl': Printhaus, 2009. pp. 53–63.

2. Bel'kova N.L., Dzjuba E.V., Suhanova E.V., Hanaeva T.A. Adaptacija metodov molekuljarno-geneticheskogo analiza dlja izuchenija mikroorganizmov, associirovannyh s rybami. Biologija vnutrennikh vod. 2008; 2: pp. 91–94.

3. Knizhin I.B., Wais S.J., Sushnik S. Khariucy basseiyna ozera Baykal (Thymallus, Thymallidae): raznoobrazie form i ikh taksonomicheskiy status, Voprosy ihtiologii. 2006; T. 46, no. 4: pp. 442–459.

4. Kuz'mina V.V. Fiziologo-biokhimicheskie osnovy ekzotrofii ryb. M.: Nauka, 2005: 300 p.

5. Maksimova N.V., Dzyuba E.V. Rol' molljuskov v pitanii chernogo-baykal'skogo khariusa (*Thymallus arcticus baicalensis*), Chetvertaja vereschaginskaja baykal'skaja konferencija: tezisy dokladov i ctendovykh soobscheniy. Irkutsk: Izd-vo In-ta geografii SO RAN, 2005: pp. 119–120.

6. Tugarina P.Ja., Kupchinskaja E.S. Pitanie i pischevye vzaimootnoshenija ryb Baykalo-Angarskogo basseyna, Novosibirsk: Nauka, 1977: 103 p.

7. Tugarina P.Ja. *Khariusy Baykala*, Novosibirsk: Nauka, 1981: 280 p.

8. Jørgensen N.O., Brandt K.K., Nybroe O., Hansen M. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2009; 59(9): pp. 2195–2199.

9. Kim D.-H., Brunt J., Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), *J. Appl. Microbiol*. 2007; vol. 102: pp. 1654–1664.

10. Ringø E., Sperstad S., Myklebust R., Mayhew T.M., Olsen R.E. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.), *Aquaculture Res.* 2006; vol. 37, no. 9: pp. 891–897.

11. Smirnov V.V. Intraspecific structure of Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi), *Pol. Arch. Hydrobiol*. 1992; Vol. 39, no. 3–4: pp. 325–333.

12. Ward N.L., Steven B., Penn K., Methe B.A., Detrich W.H. III Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species, *Extremophiles*. 2009; Vol. 13: pp. 679–685.

13. Wu X., Sun J., Zhang W., Wen B. Purification and antigenic characteristics of a rickettsia-like organism from the oyster *Crassostrea ariakensis*, *Dis. Aquat. Org*. 2005; Vol. 67: pp. 149–154.

Рецензенты:

Анганова Е.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории эпидемически и социально значимых инфекций, ФГБНУ НЦ «Проблем здоровья семьи и репродукции человека» ФАНО, г. Иркутск;

Савилов Е.Д., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ НЦ «Проблем здоровья семьи и репродукции человека» ФАНО, г. Иркутск.

Работа поступила в редакцию 26.11.2014.