



УДК [591.429.4:597.553.2]:534.6

Поиск факторов, определяющих разнообразие генотипов кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса

Е. В. Суханова¹, Е. В. Дзюба¹, Н. Н. Деникина¹, О. Т. Русинек², Н. Л. Белькова¹

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

² Байкальский музей ИНЦ СО РАН, п. Листвянка

E-mail: nbelkova@gmail.com

Аннотация. Проведен поиск условий молекулярно-генетического анализа с целью получения максимального разнообразия генотипов кишечной микрофлоры рыб на примере черного байкальского хариуса. Анализировали влияние как основных методических, так и некоторых экологических факторов на разнообразие и состав полученных генотипов. Варьировали методы выделения тотальной ДНК и условия проведения полимеразной цепной реакции. Исследовали возможное влияние условий обитания (естественные водоемы и аквариумная экспозиция) и особенностей структурной и функциональной организации разных отделов кишечника рыб. Определены условия для получения максимального генетического разнообразия организмов кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса.

Ключевые слова: микроорганизмы, кишечная микрофлора рыб, методы молекулярно-генетического анализа, рибосомные гены, озеро Байкал.

Введение

Современные методы молекулярно-генетического анализа, включающие секвенирование рибосомных генов посредством выделения ДНК и амплификации, а также групп- и видоспецифичную гибридизацию, становятся мощным инструментом для изучения кишечной микрофлоры рыб. Первоначально эти методы широко использовали для уточнения видовой принадлежности культивируемых штаммов и для быстрой и эффективной видоспецифичной диагностики бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний рыб [10; 21 и др.]. В настоящее время в научной литературе все чаще стали появляться результаты исследований нормальной кишечной микрофлоры рыб, полученные с использованием молекулярно-генетического анализа [11; 17; 14 и др.]. Большинство авторов отмечают различия в разнообразии доминирующей микрофлоры, полученные с применением классического микробиологического подхода и молекулярно-генетических методов [21; 14 и др.]. Известно, что состав кишечной микрофлоры у рыб на разных возрастных стадиях или имеющих различные типы питания варьирует и зависит также от условий обитания [13; 16; 19]. Кроме того, при проведении молекулярно-генетического анализа необходимо учитывать, что результат за-

висит от правильного методического выбора оптимальных условий забора биологического материала, метода выделения суммарной ДНК и условий получения специфичного ПЦР-продукта [1].

Микрофлора рыб озера Байкал и его бассейна практически не изучена. Ранее методы молекулярно-генетического анализа адаптированы нами для изучения сообществ микроорганизмов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) байкальских рыб, особое внимание уделено эндемичному представителю семейства *Thymallidae* – черному байкальскому хариусу [1; 2]. Целью настоящего исследования стал поиск факторов, определяющих получение максимального разнообразия генотипов кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили особи черного байкальского хариуса (*Thymallus baicalensis* Dybowsky, 1874) из р. Ангары (1 экз.) и Иркутского водохранилища (1 экз.). Кроме этого, нами использован один экземпляр, содержащийся в условиях экспозиционного аквариума Байкальского музея ИНЦ СО РАН в течение трех лет. Для выделения тотальной геномной ДНК в стерильных условиях взяты фрагменты переднего, среднего и заднего от-

делов кишечника, материал сразу же обрабатывался буферными растворами.

Выделение тотальной геномной ДНК проводили, используя три разных метода, как было описано ранее [1]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК бактерий (в скобках дана нумерация нуклеотидов по *Escherichia coli*) 500L (514–533) и 1350R (1389–1407) [5]. Амплификацию вели при температурах отжига 50 и 72 °С в амплификаторе Techne (Германия). Для лигирования бактериального ПЦР-продукта использовали набор GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва). Компетентные клетки *E. coli* (штамм XL-1) для трансформации получали по методике трансформации CaCl₂-зависимых клеток [20]. Для скрининга клонов, содержащих вставку нужной длины, проводили амплификацию с 1 мкл лизата «кипяченных» клеток, используя праймеры, рекомендованные производителем плазмидного вектора (Fermentas, Литва). Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в Новосибирском приборном центре коллективного пользования СО РАН. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>). Проверка полученных последовательностей на наличие химерных структур проведена программой CHECK CHIMERA (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera>). Полученные последовательности частично зарегистрированы в международной EMBL-базе данных, им присвоены следующие номера: FM897201–FM897210.

Результаты и обсуждение

Пробы суммарной ДНК выделены из кишечника рыб тремя способами. Для лигирования использовали бактериальные ПЦР-продукты, полученные в амплификации с температурами отжига 50 и 72 °С. По результатам клонирования и последующего скрининга клонов получены полноразмерные вставки длиной около 900 пар оснований (п. о.), которые были сгруппированы в несколько групп перед секвенированием. Для 78 клонов проведено определение нуклеотидных последовательностей, их длина варьировала от 720 до 891 п. о. Проверка последовательностей программой CHECK CHIMERA выявила 6 химерных структур, которые были исключены из дальнейшего анали-

за. Сравнительный анализ полученных последовательностей выявил, что последовательности, полученные с препаратов ДНК, выделенной набором РИБО-сорб (рис. 1), преимущественно показали максимальную гомологию с представителями рода *Mycoplasma* (16 шт.). Среди последовательностей, полученных после клонирования ПЦР-продуктов с препаратов суммарной ДНК, выделенной методом модифицированной цетавлоновой очистки [4], определены последовательности представителей рода *Mycoplasma* (9 шт.), некультивируемой спирохеты (7 шт.) и эукариотического микроорганизма *Spirocheta barkhanus* (2 шт.). Среди последовательностей, полученных в результате выделения ДНК методом ферментативного лизиса, кроме представителей вышеуказанных групп, получены последовательности, имеющие высокую гомологию с последовательностями бактерий рода *Acinetobacter* (1 шт.), *Enterobacter* (1 шт.), *Pseudomonas* (3 шт.) и *Pantoea* (1 шт.) (рис. 1). Таким образом, условно мы выделили два доминирующих генотипа *Mycoplasma* и *Spirochaeta*, а представителей остальных групп микроорганизмов, включая эукариотических Diplomonadida, объединили в группу, названную «сопутствующая микрофлора». При варьировании температуры отжига в амплификации показано, что при температуре 72 °С преимущественно амплифицируется доминирующий генотип *Mycoplasma*. Увеличение выборки нуклеотидных последовательностей в данном случае привело к относительно незначительному повышению количества генотипов сопутствующей микрофлоры. При температуре отжига 52 °С даже при небольшой выборке последовательностей (20 шт.) получены последовательности как доминирующих генотипов, так и разные представители сопутствующей им микрофлоры. Сопоставление разнообразия генотипов в разных отделах кишечника черного байкальского хариуса (рис. 2) показало, что в переднем и среднем отделах кишечника преимущественно выявляются представители *Mycoplasma*, а наибольшее разнообразие обнаружено в заднем отделе. Кроме того, нами отмечено отсутствие представителей филогенетической группы *Spirochaeta* у черного байкальского хариуса из аквариумной экспозиции Байкальского музея ИНЦ СО РАН (рис. 3).

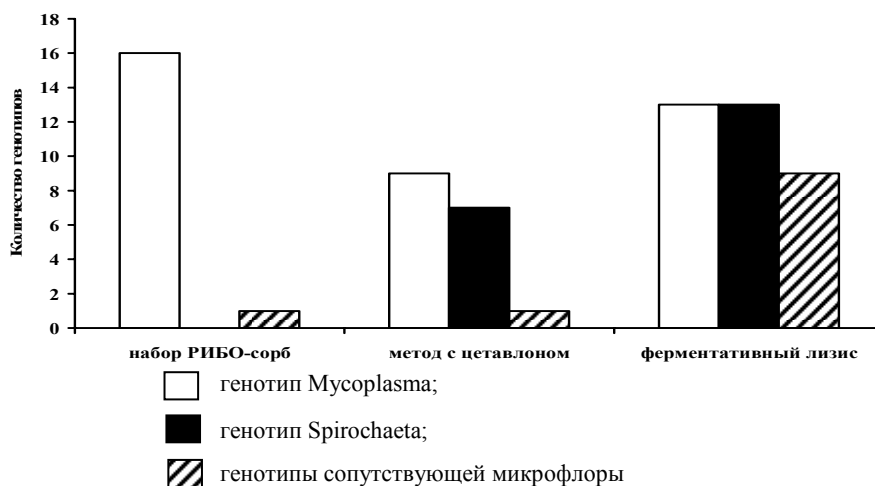


Рис. 1. Генетическое разнообразие кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса, выявляемое в микробном сообществе при использовании разных методов выделения суммарных нуклеиновых кислот

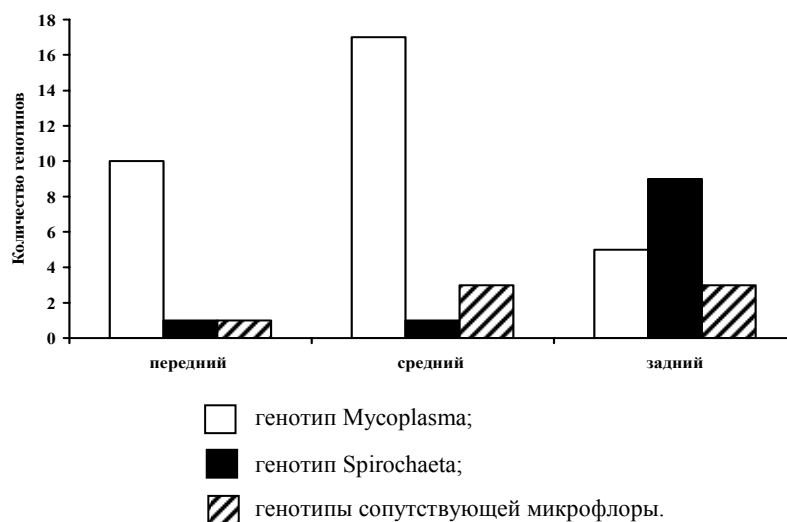


Рис. 2. Генетическое разнообразие микрофлоры в переднем, среднем и заднем отделах кишечника черного байкальского хариуса

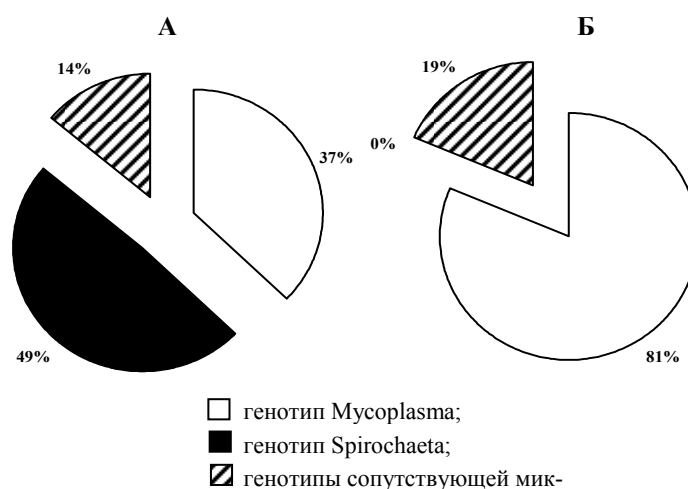


Рис. 3. Генетическое разнообразие кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса из природных водоемов (А) и аквариумной экспозиции Байкальского музея ИНЦ СО РАН (Б)

Способ лизиса бактериальных клеток на этапе выделения ДНК влияет на разнообразие бактериальных последовательностей, получаемых после амплификации, лигирования и клонирования бактериального ПЦР-продукта. Наши результаты показали, что максимальное разнообразие нуклеотидных последовательностей получается с использованием метода ферментативного лизиса и с помощью цетавлона [1; 4]. Следовательно, для получения максимального разнообразия бактериальных последовательностей необходимо использовать несколько методов выделения ДНК и проводить анализ суммарной пробы.

Известно, что существуют принципиальные различия в структурной и функциональной организации разных отделов кишечника рыб [9]. Изменение разнообразия микрофлоры в целом и доминирование отдельных групп в разных отделах ЖКТ рыб является предметом особого интереса исследователей [11]. Нами показано, что в переднем, среднем и заднем отделах кишечника черного байкальского хариуса доминируют разные микроорганизмы. В переднем и среднем отделах кишечника – это микроорганизмы, близкие по генотипу к *Mycoplasma moatsii*, а в заднем отделе – некультивируемые бактерии из филогенетической группы Спирохеты (рис. 2). Разные представители сопутствующей микрофлоры определены преимущественно в среднем и заднем отделах – это организмы, имеющие гомологию с бактериями разных семейств гамма-подгруппы Протеобактерий. Кроме бактериальных получены последовательности, имеющие гомологию (99,8 %) с представителями паразитических эукариотических простейших *S. barkhanus* [3]. В целом следует отметить невысокое разнообразие кишечной микрофлоры исследуемого вида, среди представителей которой в качестве доминирующих получены последовательности, имеющие гомологию с генотипом *Mycoplasma* из рыб других естественных водоемов [11; 17; 14].

Следует отметить наличие спирохет у хариуса из Ангары и Иркутского водохранилища, что, вероятно, объясняется особенностями питания и экологии рыб. По характеру питания черного байкальского хариуса можно считать эврифагом, так как спектр потребляемых им организмов очень широк и включает в себя как животных бентоса (личинки ручейников, амфипод, гастропод и др.), так и объекты, потребляемые с поверхности воды (преимущественно имаго насекомых) [7; 8 и др.]. Известно,

что спирохеты были найдены у моллюсков [12; 15; 18 и др.], в том числе и у байкальских видов *Gastropoda* и *Bivalvia* (д-р биол. наук Т. Я. Ситникова, устное сообщение). В пищевом спектре черного байкальского хариуса из озера Байкал отмечены 14 видов моллюсков [6]. Однако для уточнения видового разнообразия спирохет и выявления их функциональной роли у рыб необходимо проведение дальнейших исследований. Мы предполагаем, что отсутствие спирохет у рыб из аквариумной экспозиции Байкальского музея ИНЦ СО РАН вероятнее всего объясняется особенностями кормления (фарш из филе мороженой рыбы и сухие комбикорма). Учитывая, что исследованный нами экземпляр находился в аквариумной экспозиции в течение трех лет, эти условия могли привести к подобным изменениям в составе доминирующих генотипов его кишечной микрофлоры.

Выводы

1. Использование комплекса разных методов выделения суммарной ДНК для изучения генетического разнообразия микрофлоры кишечника рыб позволяет получить широкий набор последовательностей, имеющих максимальное сходство с различными организмами.
2. При исследовании разнообразия кишечной микрофлоры рыб необходимо учитывать не только такие факторы, как приуроченность отдельных генотипов микроорганизмов к определенным отделам ЖКТ рыб, но и особенности экологии рыб (возраст, особенности питания и условий обитания).
3. Полученные результаты показывают перспективность использования современных молекулярно-генетических методов для микробиологического мониторинга природных водоемов и могут быть востребованы в различных областях аквакультуры.

Работа выполнена в рамках программы РАН №23, подпрограмма 1, проект 23.13 (2009–2010 гг.).

Литература

1. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами / Н. Л. Белькова [и др.] // Биология внутренних вод. – 2008. – № 2. – С. 91–94.
2. Белькова Н. Л. Исследование микрофлоры желудочно-кишечного тракта рыб озера Байкал: разработка эффективных методов выделения суммарной ДНК / Н. Л. Белькова, Т. А. Ханаева, Е. В. Дзюба // Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов : Материа-

- лы 1-й междунар. науч.-практ. конф. – М. : Изд-во ВНИРО, 2006. – С. 132–133.
3. Белькова Н. Л. Молекулярно-генетическая детекция непатогенного генотипа *Spiroucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) в черном байкальском хариусе (*Thymallus arcticus baicalensis* Dybowski, 1874) / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, Е. В. Суханова // Изв. РАН. Сер. биол. – 2008б. – Т. 35, № 2. – С. 253–256.
4. Грачев М. А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции / М. А. Грачев, С. Ю. Кузнецова, Т. А. Щербакова // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 180–183.
5. Денисова Л. Я. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК / Л. Я. Денисова // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 4. – С. 475–483.
6. Максимова Н. В. Роль моллюсков в питании черного байкальского хариуса (*Thymallus arcticus baicalensis*) / Н. В. Максимова, Е. В. Дзюба // Четвертая Верещагинская Байкальская конференция : тез. докл. и стендовых сообщений (Иркутск, 26 сент. – 1 окт., 2005). – Иркутск, 2005. – С. 119.
7. Тугарина П. Я. Питание и пищевые взаимоотношения рыб Байкало-Ангарского бассейна / П. Я. Тугарина, Е. С. Купчинская. – Новосибирск : Наука, 1977. – 103 с.
8. Тугарина П. Я. Хариусы Байкала / П. Я. Тугарина. – Новосибирск : Наука, 1981. – 280 с.
9. Уголев А. М. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб / А. М. Уголев, В. В. Кузьмина. – СПб. : Гидрометеоздат, 1993. – 238 с.
10. Buller N. B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual / N. B. Buller. – Oxfordshire : CABI publishing. – 2004. – 361 p.
11. Dominance of *Mycoplasma* in the guts of the long-jawed mudsucker, *Gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes / N. Bano [et al.] // Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 9. – P. 2636–2641.
12. Clements K. D. An Unusual Symbiont from the Gut of Surgeonfishes May Be the Largest Known Prokaryote / K. D. Clements, S. Bullivant // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173, N 17. – P. 5359–5362.
13. Hansen G. H. Bacterial interaction in early life stages of marine cold water fish / G. H. Hansen, J. A. Olafsen // Microb. Ecol. – 1999. – Vol. 38. – P. 1–26.
14. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / M. B. Hovda [et al.] // Aquaculture. – 2007. – Vol. 272. – P. 581–588.
15. Johnson R. C. The Spirochetes / R. C. Johnson // Ann. Rev. Microbiol. – 1977. – Vol. 31. – P. 89–106.
16. Moran D. Ontogenetic development of the gastrointestinal microbiota in the marine herbivorous fish *Kyphosus sydneyanus* / D. Moran, S. J. Turner, K. D. Clements // Microb. Ecol. – 2005. – Vol. 49. – P. 590–597.
17. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon / W. E. Holben [et al.] // Microb. Ecol. – 2002. – Vol. 44. – P. 175–185.
18. Phylogenetic Position of the Spirochetal Genus *Cristispira* / B. J. Paster [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62, N 3. – P. 942–946.
19. Ringo E. Lactic acid bacteria in fish: a review / E. Ringo, F.-J. Gatesoupe // Aquaculture. – 1998. – Vol. 160. – P. 177–203.
20. Sambrook J. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Vol. 2. / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. // Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – 345 p.
21. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification / B. Spanggaard [et al.] // Aquaculture. – 2000. – Vol. 182. – P. 1–15.

Search for factors determining the diversity of intestinal microflora genetic pools in black Baikalian grayling

E. V. Sukhanova¹, E. V. Dzyuba², N. N. Denikina¹, O. T. Rusinek², N. L. Bel'kova^{1,3}

¹Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

²Baikal Museum ISC SB RAS, Listvyanka

³Irkutsk State University, Irkutsk

Abstract. Search for conditions of molecular genetics analysis aimed to obtaining of maximal diversity of intestinal microflora genetic pools in fish (black Baikalian grayling) was performed. We analyzed the influence of both main methodological and of some ecological factors onto the diversity and the composition of the genetic pools obtained. Methods of extraction of total DNA and conditions of polymerase chain reaction was varied. Probable impact of habitat conditions (natural water bodies and aquariums) and peculiarities of structural and functional organization of different intestine segments in fishes were investigated. Conditions for obtaining of maximal genetic diversity of intestinal microflora organisms of black Baikalian grayling are determined.

Key words: microorganisms, fish intestinal microflora, methods for molecular genetics analysis, ribosomal genes, Lake Baikal.

Суханова Елена Викторовна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
лаб. водной микробиологии
аспирант
тел. (3952)42-54-15
E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Дзюба Елена Владимировна
Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
лаб. биологии рыб и водных млекопитающих
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
тел. (3952)42-54-15
E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Деникина Наталья Николаевна
Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
лаб. аналитической биоорганической химии, кандидат
биологических наук, старший научный сотрудник
тел. (3952)42-54-15
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Русинек Ольга Тимофеевна
Байкальский музей Иркутского научного центра СО РАН,
664520, Иркутская область, пос. Листвянка,
ул. Академическая, 1
доктор биологических наук, главный специалист
тел. (3952)25-05-51
E-mail: rusinek@isc.irk.ru

Белькова Наталья Леонидовна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
лаб. водной микробиологии
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
тел. (3952)42-54-15
E-mail: nlbelkova@gmail.com

Sukhanova Elena Viktorovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Laboratory of Aquatic Microbiology
doctoral student
phone: (3952) 42-54-15
E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Dzyuba Elena Vladimirovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Laboratory of Fish and Freshwater Mammals Biology
Ph. D. of Biology
senior research scientist
phone: (3952)42-54-15
E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Denikina Natalja Nikolaevna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Laboratory of Analytical and Bioorganic Chemistry
Ph. D. of Biology, senior research scientist
phone: (3952)42-54-15
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Rusinek Olga Timofeevna
Baikal Museum ISC SB RAS
1 Akademicheskaya St., Listvyanka settl.,
Irkutsk region, 664520
D. Sc. of Biology, senior specialist
phone: (3952)25-05-51
E-mail: rusinek@isc.irk.ru

Belkova Natalia Leonidovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Laboratory of Aquatic Microbiology
Ph. D. of Biology
senior research scientist
phone: (3952)42-54-15
E-mail: nlbelkova@gmail.com