

УДК 579.64:631.46(574.1)

¹Н.Х. Сергалиев, ²Е.Е. Андронов, ²А.Г. Пинаев, ¹М.Г. Какишев*, ¹Р.А. Захарян
¹Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана, Казахстан
²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии
*E-mail: kakishev_murat@mail.ru

Использование методов современной метагеномики в оценке микробиоты почв Западно-Казахстанской области

В данной статье приведена методика по оценке микробиома почв с применением методов современной метагеномики. Описан метод очистки почвенной ДНК с использованием сорбции на очищенном кремнии. Выявлены данные по оптимизации условий ПЦР и подбору праймеров. Для оценки метагенома почвы составлена ампликонная библиотека и проведен ее первичный анализ. Выявлены наиболее преобладающие филы в данных образцах почв.

Ключевые слова: микробиома, почвенные микроорганизмы, ПЦР, секвенирование, таксономия, тип почвы, ДНК, агроэкология, мониторинг, молекулярная биология.

N.H. Sergaliev, E.E. Andronov, A.G. Pinaev, M.G. Kakishev, R.A. Zaharyan
**Use of modern metagenomics approaches in evaluation of soil microbiota
of West Kazakhstan area**

This article describes a method to assess the soil microbiome with application of modern metagenomics. The method to clean soil DNA using adsorption on purified silicon. Identified data for optimization of PCR primer design. To assess the soil metagenome library composed of amplicons and held its initial analysis. Revealed the most prevalent phyla in these soil samples.

Keywords: microbiome, soil microorganisms, PCR, sequencing, taxonomy, soil type, DNA, agroecology, monitoring, molecular biology.

Н.Х. Сергалиев, Е.Е. Андронов, А.Г. Пинаев, М.Г. Какишев, Р.А. Захарян
**Батыс Қазақстан облысы топырақтарының микробиота жағдайын бағалауда
заманауи метагеномика әдістерін қолдану**

Мақалада заманауи метагеномика әдістерін қолдану арқылы топырақ микробиомасын бағалау әдістері келтірілген. Тазаланған кремний негізіндегі сорбция қолдану арқылы топырақ ДНК тазалау әдісі көрсетілген. Топырақ метагеномын бағалау үшін ампликондық библиотека жасақталып оның алғашқы талдауы өткізілген, ПТР жағдайларын оңтайландыру және праймерлер таңдау бойынша мәліметтер алынған. Топырақ сынамаларындағы басым филдар анықталды.

Түйін сөздер: микробиома, топырақ микроорганизмдері, ПТР, секвенирлеу, таксономиялық, топырақ типтері, ДНК, агроэкология, мониторинг, молекулярлық биология.

Традиционные методы анализа почвы дают весьма грубые и неоднозначные результаты. Так, например, почвы с одними и теми же агрохимическими характеристиками могут иметь кардинальные различия в плодородии. Ответственными за такие различия часто являются трудновывяляемые факторы. Например, при почвоутомлении. Далеко не всегда удается выявить весь микробный состав той или иной почвы, так как большая часть микроорганизмов является просто не культивируемой в лабораторных условиях. Поэтому традиционный микробиологический подход к

исследованию почвенных микроорганизмов не дает полной картины о микрофлоре исследуемых почв, а значит не позволяет дать полную оценку микробиологическим процессам протекающим в ней. В настоящей работе для характеристики почв выбран ее микробиом, главной составной частью которого является геномный пул микроорганизмов – та часть почвы, которая наиболее чутка к любым изменениям. Связь особенностей микробиома почвы и ее плодородия почти не исследована. Для понимания этой связи требуется проведение комплексной работы.

В мировой микробиологии за последние двадцать лет произошла настоящая революция, связанная с пониманием истинных масштабов биологического разнообразия прокариот. Произошло это во многом благодаря бурному развитию и внедрению в экологическую практику методов молекулярной биологии. На сегодняшний день исследования в области молекулярной экологии микроорганизмов объединяются под общим названием – метагеномные исследования. Этот термин был выбран исходя из аналогии со статистическим методом мета-анализа (анализа массива эмпирических фактов, направленных на решение сходных задач). Смысл его заключается в изучении сходных, но не идентичных единиц генетической информации. Объектом изучения метагеномики является метагеном – генетический материал, полученный непосредственно из окружающей среды без предварительного культивирования микроорганизмов. Одним из первых исследований в этой области является работа 1984 года, в которой авторами на основе анализа полиморфизма гена 5S рРНК был сделан вывод о таксономическом составе симбиотического сообщества вестиментиферы *Riftia pachyptila*. В дальнейшем, с выходом работы Карла Воза «Бактериальная эволюция» («Bacterial evolution», 1987), появилась фундаментальная идея о возможности классификации прокариотных организмов на основе различий в генах их рибосомных РНК. Это важное обобщение полностью определило направление для развития будущих исследований в этой области [1, 2].

Основным направлением данного исследования является применение методов современной метагеномики для оценки почвенного микробиома. Основная идея, лежащая в основе исследований – анализ структуры почвенного микробиома с использованием методов современной метагеномики (секвенаторов нового поколения, обеспечивающих одновременное чтение десятков тысяч нуклеотидных последовательностей) как чувствительного индикатора состояния почвы, в котором отражается весь комплекс ее свойств, включая биологические, а также широкий ряд трудно учитываемых или неучитываемых факторов, влияющих на почвенное плодородие и сельскохозяйственный потенциал почв. В дальнейшем на основе данных массового скрининга почв Западно-Казахстанской области предполагается разработать систему микробио-

много мониторинга почв сельскохозяйственного назначения, обеспечивающую адекватную оценку их агроэкологического состояния и разработку методов оптимизации использования почв [3, 4, 5].

Профиль каштановых почв дифференцируется на ряд отчетливо выраженных генетических горизонтов. Ад – дернина (на целинных почвах), мощность 2 – 3 см. Верхний гумусовый горизонт (А) темно-каштанового цвета, комковатой структуры, мощностью 18 – 22 см. За ним идет гумусовый переходный горизонт (В1) серовато-бурой окраски, крупнокомковатый структуры с буровато-коричневой лакировкой на гранях структурных отдельностей, придающей горизонту более темную окраску и коричневатый (каштановый) оттенок. Общая мощность гумусового горизонта – 35-50 см.

Под горизонтом гумусовых затеков залегает горизонт максимального скопления карбонатов (Вк) буровато-желтого цвета, призмовидно-ореховатой структуры, плотного сложения от наличия карбонатов и солонцеватости в нем.

Материалы и методы

Отбор проб почв проводился согласно ГОСТ 17.4.4.02-84. Точечные пробы отбирали на площадке из двух слоев – 0-10 см и 10-20 см, по диагонали с таким расчетом, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов или слоев данного типа почвы.

Для проведения молекулярно-биологических исследований микробиома почвенных образцов была применена типичная схема эксперимента. Схема типичного эксперимента заключается в выделении и очистке совокупной ДНК из образца, отобранного из окружающей среды, ПЦР-амплификации определенных участков генома, их клонировании с последующим определением и анализом нуклеотидных последовательностей (секвенированием). В том случае, когда секвенированию подвергается вся выделенная ДНК, речь идет о новейшей области исследования, называемой «метагеномикой», т.е. описанием совокупного генома всех живых организмов данного местообитания. Частным случаем метагеномики является ограничение секвенируемых участков таксономически значимыми генами, например, широко используемыми в молекулярной таксономии рибосомальными

генами 16S рРНК (для прокариот) и 18S рРНК (для эукариот). Такие исследования позволяют наиболее полно выявить таксономический состав анализируемого микробного сообщества. Результатом секвенирования библиотеки рибосомальных генов является набор нуклеотидных последовательностей длиной от 200 до 1500 пн, количество которых для одного проанализированного образца варьирует от 100 до 1-2 тысяч последовательностей. Дальнейший анализ полученных нуклеотидных последовательностей

предполагает их таксономическую характеристику (путем сравнения с образцовыми базами данных), сопоставление библиотек друг с другом, вычисление коэффициентов генетического разнообразия и т.д.

В ходе работ по данному этапу проекта была создана коллекция из 4 образцов почв, относящихся к основным типам почв Западно-Казахстанской области, представляющих собой целинные земли (Таблица 1). Данные об отобранных пробах приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Пробы почв

№ по порядку	Тип почв	Место отбора	GPS координаты	Глубина отбора
1	темно-каштановая	п. Новопавловка	N51°06.823' E 051°39.694'	0-10 см
2				10-20 см
3	чернозём	п. Щукино	N51°40.301' E 050°48.889'	0-10 см
4				10-20 см

Результаты и их обсуждение

Описание разрезов проб почв:

Каштановая.

GPS точка 435. высота 29м. 50.52.599.с.ш., 51.06.489 в.д.

A1 0-15 см – темно-серый, сухой, тяжелосуглинистый, много корней, рыхлый, мелкокомковатый, слабо вскипает с поверхности, переход постепенный по структуре.

B1 15-50 см – темно-серый, сухой, тяжелосуглинистый, рыхлый, крупнокомковатый, вскипание слабое, переход заметный по цвету и структуре.

B2 50-67 см – буровато-серый, сухой, тяжелосуглинистый, корни единичны, уплотнен, ореховато-комковатый, вскипание сильное, переход заметный по цвету и структуре.

BC 77-165 см – бурый, сухой, супесчаный, корней нет, уплотнен, непрочно-комковатая, вскипание сильное, переход постепенный по цвету и структуре.

C 77-165 см – желтый, сухой, супесчаный, корней нет, уплотнен, бесструктурный, вскипание сильное.

Чернозём южный.

GPS точка 425. высота 148м. 51.40.301.с.ш., 50.48.889. в.д.

Ап 0-15 см – темно-серый, сухой, тяжелосуглинистый, много корней, уплотнен, пылеватокомковатая, вскипания нет, переход постепенный по структуре.

B1 15-37 см – темно-серый, сухой, тяжелосуглинистый, много корней, уплотнен среднекомковатая, вскипания нет, переход постепенный по цвету и структуре.

B2 37-55 см – буровато-серый, сухой, тяжелосуглинистый, мало корней, уплотнен, ореховатокомковатая, вскипания нет, переход постепенный по цвету и структуре.

BC 55-120 см – бурый, увлажнен, среднесуглинистый, корни единичны, плотный, глыбисто-комковатая, вскипание сильное, карбонаты в виде примазок, переход постепенный по цвету и структуре.

C 120-170 см – желтый, увлажнен, среднесуглинистая, нет корней, плотный, бесструктурная, вскипание бурное.

Для секвенирования ДНК из почв были подобраны следующие праймеры для библиотек Lib-L. **Праймеры состоят из следующих компонентов:** стандартный адаптер для эмульсионной ПЦР и праймера для секвенирования, метка библиотеки, десятинуклеотидный мультиплексный идентификатор, фрагмент для специфического связывания с гипервариабельным (V4) участком

гена 16S рРНК, эффективно амплифицирующими как бактериальные, так и архейные гены. Общий размер прямого мультиплексного праймера – 59 н. Обратный праймер построен по такому же принципу, за исключением отсутствия мультиплексного идентификатора. Всего синтезированы 20 мультиплексных прямых и один обратный праймер. Наличие 10-нуклеотидной мультиплексной метки позволяет идентифицировать принадлежность каждого из просеквенированных фрагментов к одной из библиотек.

Оптимизацию условий проведения полимеразной цепной реакции проведена с учетом имеющихся литературных данных. Оптимизация велась по трем направлениям: температурный профиль, временной профиль реакции, состав реакционной смеси.

Была разработана программа амплификации ДНК в соответствии с термическим профилем, наиболее подходящим для выбранных праймеров, в данном случае 95°C – 30 с; 55°C – 30 с; 72°C – 1 мин, всего 30 циклов) с использованием полимеразы Encyclo (Евроген, Россия)

В процессе выделения ДНК из почвы использовали стандартное общелабораторное оборудо-

дование для работ по молекулярной микробиологии – автоматические дозаторы, центрифуги, оборудование для электрофореза, визуализации и документирования гелей, холодильники, морозильные камеры, вихревые и т.д.

Для разрушения образцов почв использовали прибор FastPrep®-24 фирмы MP Biomedicals с адапторами для 2 мл пробирок. В качестве матрикса для разрушения использовали смесь стеклянных шариков диаметром 0,1 и 0,5 мм (1:1 по весу) в количестве, равном весу образца почвы.

Для очистки препаратов ДНК использовали свежеперегнанный насыщенный буфером фенола, приготовленного по обычной методике.

Для выделения ДНК из агарозы использовали окись кремния производства фирмы SIGMA без какой-либо специальной обработки. Использовали обычную агарозу использовали для проверки качества выделенной ДНК и в методе выделения ДНК из геля с использованием окиси кремния.

На рисунке 1 показаны результаты электрофоретического разделения образцов почвенной ДНК после очистки сырого экстракта с использованием сорбции на диоксиде кремния.

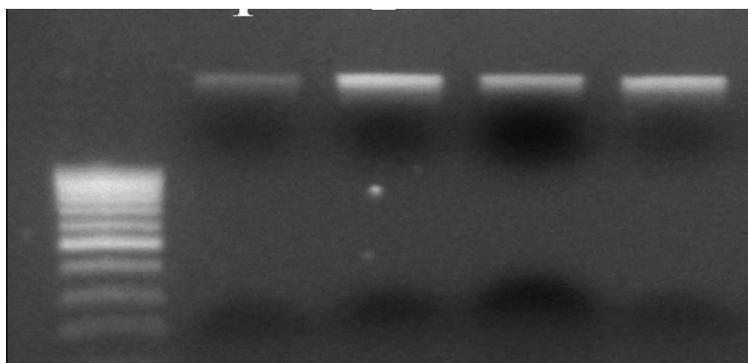


Рисунок 1 – Препараты почвенной ДНК, очищенные методом электрофореза

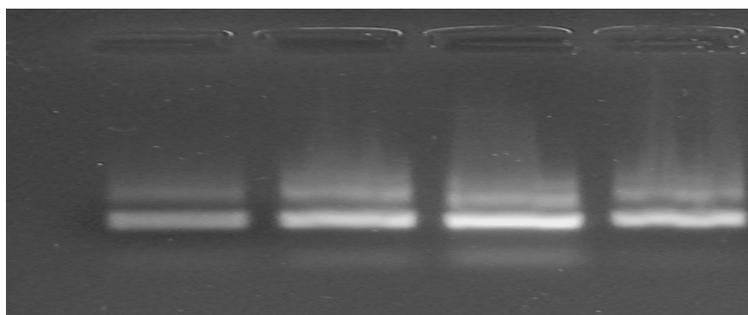


Рисунок 2 – Амплифицированные препараты почвенной ДНК

Для проведения ПЦР были использованы мультиплексные праймеры с целью создания библиотек гена 16S рРНК для последующего анализа на секвенаторе. Постановка ПЦР проводилась согласно оптимально подобранной программы амплификации. Все праймеры амплифицировали фрагмент ожидаемого размера с высокой эффективностью и приемлемой специфичностью (рисунок 2).

С использованием 20 разработанных мультиплексных fusion-праймеров и почвенной ДНК, выделенной из 4 образцов почв, были получены

4 ампликонных библиотеки фрагмента гена 16S рРНК. Их концентрации были выровнены с использованием гель-денситометрии, затем амплификаты были объединены, переочищены путем выделения суммарной библиотеки из геля. Разрушение мультимеров проводили путем прогревания библиотеки при 65°C в течение 10 мин с последующим охлаждением на льду. Самый легкий фрагмент соответствует библиотеке, серия фрагментов большего размера соответствует мультимерам, образующимся при выделении фрагмента из геля (рисунок 3).

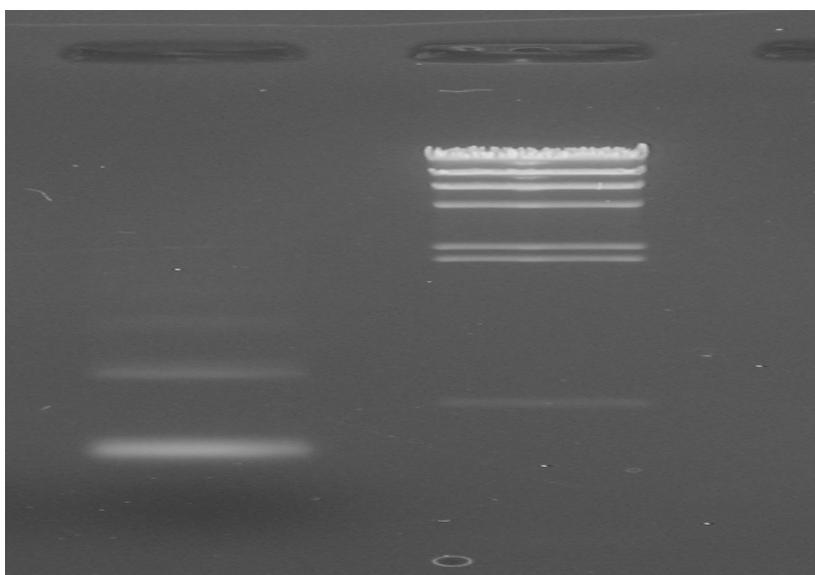


Рисунок 3 – Ампликонная библиотека образцов почв

Секвенирование библиотеки было проведено в точном соответствии с рекомендациями к прибору. На первом этапе была проведена эмульсионная ПЦР, затем обогащение библиотеки, которое составило 15% (при допустимом интервале 5-20%) и, наконец, собственно секвенирования, которое прошло без нарушений. Все последовательности были рассортированы по мультиплексным идентификаторам с использованием Pyrosequencing pipeline на сервере RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Первичный таксономический анализ библиотек проводили на сервере RDP с использованием опции Classifier. Визуализацию распределения бактериальных и архейных фил в библиотеках, а также оценку параметров таксономического раз-

нообразия проводили на сервере VAMPS (<http://vamps.mbl.edu/>).

Из приведенных данных следует, что к филлам, имеющим наибольшую долю в микробных сообществах проанализированных почв, относятся *Actinobacteria* и *Proteobacteria* но в темно-каштановой почве их значительно меньше. Заметную долю в составе микробиомов исследованных образцов занимают археи. Также представлены обычные для почвенных сообществ филы *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadales*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*.

Проведенные исследования позволят в дальнейшем проводить детальное изучение геномного пула почвенных микроорганизмов, выявить

связь между структурой почвенного микробиома и агроэкологическим состоянием почв. В дальнейшем на основе данных массового скрининга почв, предполагается разработать систему обеспечивающую адекватную оценку почв сельскохозяйственного назначения, их агроэкологическое состояния и методы эффективного мониторинга состояния почв.

Проводимые работы выполнялись в целях реализации научно-исследовательского проекта «Использование методов современной метагеномики в оценке агроэкологического состояния почв Западного Казахстана» по программе: 120 «Грантовое финансирование», номер государственной регистрации – 0112PK00513

Литература

- 1 Acinas, S.G. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample [Text] / R. Sarma-Rupavtarm, V. Klepac-Ceraj // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V.12, № 71. – P. 8966 – 8969. – ISSN 1098-5336.
- 2 Bartram, A.K. Generation of Multimillion-Sequence 16S rRNA Gene Libraries from Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads [Text] / M.D. Lynch, J.C. Stearns // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – V.11, № 77. – P. 3846 – 3852. – ISSN 1098-5336.
- 3 Brajesh, K. Singh, Soil genomics [Text] / Colin D. Campbell, Soren J. Sorenson et al. // *Nature Reviews Microbiology* – 2009. – V.7 – P. 756. – ISSN 1740-1526.
- 4 Gerlach, W. WebCARMA: a web application for the functional and taxonomic classification of unassembled metagenomic reads [Text] / S. Jünemann, F. Tille // *BMC Bioinformatics.* – 2009. – V.10. – P.430. – ISSN 1471-2105.
- 5 Warnecke, F. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite [Text] / P. Luginbühl, N. Ivanova // *Nature.* – 2007. – V.450. – P. 560 – 565. – ISSN 0028-0836.