УДК: 579.64:577:631.427

***Н.В. Патыка, А.Ю. Колодяжный, И.И. Ибатуллин***

*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Героев Обороны, 13, Киев, 03041, Украина*

# ОЦЕНКА МЕТАГЕНОМА И ДЕТЕКЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРОКАРИОТ ПОЧВЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

*В работе проведена оценка метагенома и функционально значимых филогенетических и таксономических полиморфизмов прокариот в черноземе типичном под пшеницей озимой с использованием метода пиросеквенирования. Было выявлено 1708 операционных таксономических единиц и 335 таксонов прокариот. Установлено, что в структуре метагенома прокариот чернозема типичного были представители 2 архейных и 22 бактериальных фил, абсолютные доминанты относились к Proteobacteria – 79,6 % и Actinobacteria – 12,9 %. Полиморфизм представленности прокариотных таксонов наблюдали на уровне семейств; доминирующими при этом были: Alcaligenaceae, Pseudomonadaceae, Solirubrobacteraceae, Gaiellaceae, Nitrososphaeraceae. Показано филогенетические связи между основными представителями метагенома прокариот, сформировавшиеся в черноземе типичном агроценоза пшеницы озимой. Таким образом, использование метода пиросеквенирования, кроме оценки структуры и разнообразия, открывает перспективы для исследования функциональной составляющей метагенома прокариот почвы.*

*К л ю ч е в ы е  с л о в а: метагеном, прокариоты, пиросеквенирование, таксономическая структура, функционально значимые полиморфизмы, чернозем типичный.*

Почва является основным источником формирования биологического и генетического разнообразия микроорганизмов. Успехи развития молекулярной биологии позволили разработать молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов и создать филогенетическую систематику их классификации. Вместе с этим появилась возможность исследовать видовую и функциональную структуру смешанных культур и ассоциаций микроорганизмов [1, 7].

Теоретически, ДНК, выделенная из образца почвы, являет собой тотальную ДНК всех микроорганизмов почвы и представляет метагеном почвы [17]. С помощью полимеразной цепной реакции появляется возможность соответствующими филогенетическими маркерами локализовать, детектировать и изучать гены, кодирующие рибосомальные рРНК, что способствует дальнейшему развитию исследований различных изолятов, в том числе, некультивируемых видов микробных ценозов почвы [2]. Такие методы привели к появлению новой области в микробиологии – метагеномики [10, 16].

Филогенетические исследования почвенных экосистем показали, что количество прокариотных видов, найденных в одном образце, значительно превышает количество известных культивируемых прокариот [6]. На основании реасоциации кинетики ДНК, выделенной из различных об-

© Н.В. Патыка, А.Ю. Колодяжный, И.И. Ибатуллин, 2016

разцов почвы, число геномов прокариот было оценено в диапазоне от 2000 до 18000 на грамм почвы. Таким образом, многообразие прокариот, присутствующих только в одном грамме почвы, значительно превышает численность известного каталога прокариот (16177 видов перечислены в статистике таксономического браузера Национального центра биотехнологической информации) [4, 15].

Развитие методов секвенирования нового поколения, в том числе технологии пиросеквенирования, существенно расширило возможности масштабного изучения биоразнообразия сложных многокомпонентных экосистем, особенно почвы [8]. Такой анализ позволяет выявлять реальное филогенетическое и таксономическое разнообразие компонентов почвенного микробиома, независимо от возможности их культивирования. Объем данных, получаемых в результате анализа, составляет до нескольких десятков тысяч нуклеотидных последовательностей на экспериментальный образец [2, 17].

Поэтому, **целью работы** было проведение оценки метагенома и функционально значимых полиморфизмов прокариот чернозема типичного в агроценозе пшеницы озимой в условиях различных систем земледелия с использованием метода пиросеквенирования.

**Материалы и методы.** Исследование прокариот чернозема типичного проводилось в фазу цветения пшеницы озимой из верхнего корнеобитаемого горизонта (0–20 см) в стационарном полевом опыте кафедры земледелия и гербологии НУБиП Украины. Полевой опыт предусматривал сочетание трех градаций систем земледелия на фоне дифференцированного и поверхностного основного возделывания почвы. Системы земледелия отличаются уровнем ресурсного обеспечения элементов питания: промышленная (интенсивная) – 12 т органических и 300 кг действующего вещества минеральных удобрений ($N_{92}P_{100}K_{108}$); экологическая – 24 т/га органических и $N_{46}P_{49}K_{55}$ минеральных удобрений; биологическая – 24 т/га пашни органических удобрений в севообороте без химически синтезированных агрохимикатов с применением биологических средств защиты посевов [9].

Для анализа метагенома и таксономической структуры прокариот чернозема применяли метод пиросеквенирования [14], который включал следующие этапы:

– выделение тотальной ДНК почвенных организмов; ее очистка от гуминовых кислот проводилась согласно методическим рекомендациям [8];

– ПЦР фрагмента гена 16S рРНК проводилась в амплификаторе Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, США) с использованием универсальных праймеров F515 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806 GGACTACVSGGGTATCTAAT с добавлением олигонуклеотидных идентификаторов (MID) для каждой пробы и последовательностей, необходимых для пиросеквенирования по протоколу Roche [2];

– подготовка проб, эмульсионная ПЦР и секвенирование проводилось на приборе GS Junior (Roche, США) в соответствии с методическими рекомендациями производителя;

– анализ ампликонных библиотек гена 16S рРНК осуществлялся с помощью программного модуля QIIME (версии 1.7.0). Он включал удаление из массива данных стандартных последовательностей и праймеров;

фильтрацию сиквенсов по качеству, выравнивание нуклеотидных последовательностей; проведение отбора и классификацию последовательностей на соответствие OTE (Операционная таксономическая единица) с использованием критерия 97 % сходства; определение таксономической структуры микробных комплексов и их сравнительный анализ; вычисление индексов разнообразия Шеннона и насыщенности ChaoI (сравнение предполагаемого количества OTE при соответствующих параметрах выборки с количеством экспериментально обнаруженных в образцах) [12]. Построение филогенетической дендрограммы сделано методом невзвешенной попарной кластеризации (UPGMA) с использованием программы MEGA 6.06 [13].

**Результаты и обсуждение.** По результатам проведенного пиросеквенирования образцов чернозема типичного агроценоза пшеницы озимой было получено 177384 нуклеотидных последовательностей. После удаления из массива данных стандартных последовательностей и праймеров, фильтрации сиквенсов по качеству, для метагеномного анализа было отобрано 20417 нуклеотидных последовательностей со средней длиной 252 пар нуклеотидов. Количество последовательностей в образцах варьировало от 2941 до 3792 шт., в зависимости от вариантов опыта (табл. 1). Выравнивание и классификация нуклеотидных последовательностей методом кластеризации с 97 % сходства дало возможность получить 1708 OTE. При этом их количество в вариантах опыта составило от 216 до 333 шт., в зависимости от варианта опыта, что свидетельствует о высоком уровне выявленного биоразнообразия прокариот исследуемой почвы.

**Таблица 1**

**Технические и экологические показатели разнообразия прокариот чернозема типичного в агроценозе пшеницы озимой**

| Вариант | | Количество сиквенсов, шт. | Количество OTE, шт. | Индекс ChaoI | Индекс Шеннона |
|---|---|---|---|---|---|
| Промышленная система | ДВ | 3252 | 238 | 1355,48 | 4,54 |
| | ПВ | 3441 | 223 | 1035,56 | 3,55 |
| Экологическая система | ДВ | 3278 | 284 | 1296,84 | 4,17 |
| | ПВ | 3792 | 324 | 1138,17 | 4,13 |
| Биологическая система | ДВ | 2941 | 216 | 1207,55 | 3,74 |
| | ПВ | 3713 | 333 | 1344,06 | 4,09 |

Примечание: ДВ – дифференцированное возделывание; ПВ – поверхностное возделывание

Атрибутирование метагеномных нуклеотидных последовательностей на соответствие таксономическим единицам дало возможность выявить 335 таксонов прокариот, из которых 1,8 % относились к домену *Archaea* (30 OTE) и 98,2 % – к домену *Bacteria* (1643 OTE), при этом количество неклассифицированных бактерий составило 18 % (296 OTE).

Индексы разнообразия Шеннона определены в пределах 3,55–4,54, что свидетельствует о высокой степени разнонаправленности почвенно-микробиологических процессов, которые способствуют формированию соответствующего полиморфизма прокариот чернозема типичного. Индексы насыщенности ChaoI превышали количество выявленных OTE в 3,5–5,7 раз, в зависимости от вариантов опыта. Это указывает на то, что

уровень реального биоразнообразия прокариот чернозема типичного в разы превышает экспериментально обнаруженный.

Исследования биоразнообразия и качественного состава прокариотного комплекса, проведенные классическими микробиологическими методами, дают возможность учесть только от 1 до 10 % микробного ценоза почвы [3]. А если принять во внимание колоссальный размер почвенного микробиома (до 10 млрд. клеток на г почвы) и его таксономическое разнообразие (до 10 тыс. операционных таксономических единиц), становится очевидным, что почвенная микробиология только сегодня получила реальный доступ к изучению микробного полиморфизма во всей его полноте [1, 13].

Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей показал наличие в структуре метагенома прокариот чернозема типичного представителей двух архейных (*Crenarchaeota, Euryarchaeota*) и 22 бактериальных фил (*Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, BRC1, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, OD1, Planctomycetes, Proteobacteria, TM7, Thermi, Verrucomicrobia, WS3, WYO*). При этом 67 % таксонов были идентифицированы на уровне семейства и 33 % – на уровне рода.

Абсолютными доминантами по представленности таксонов от общего количества выявленных прокариот были филы *Proteobacteria* – 79,6 % и *Actinobacteria* – 12,9 %.

Топология распределения представителей метагенома исследуемой почвы по вариантам опыта преимущественно характеризовалась изменением соотношения основных бактериальных таксонов. На уровне крупных таксономических единиц (фил) значительной дифференциации абсолютных доминантов по вариантам опыта не наблюдали. Полиморфизм представленности прокариотных таксонов позволил выявить таксономический анализ на уровне семейств. Доминирующими в структуре метагенома прокариот были семейства *Alcaligenaceae, Pseudomonadaceae, Solirubrobacteraceae, Gaiellaceae, Nitrososphaeraceae* (рис. 1).

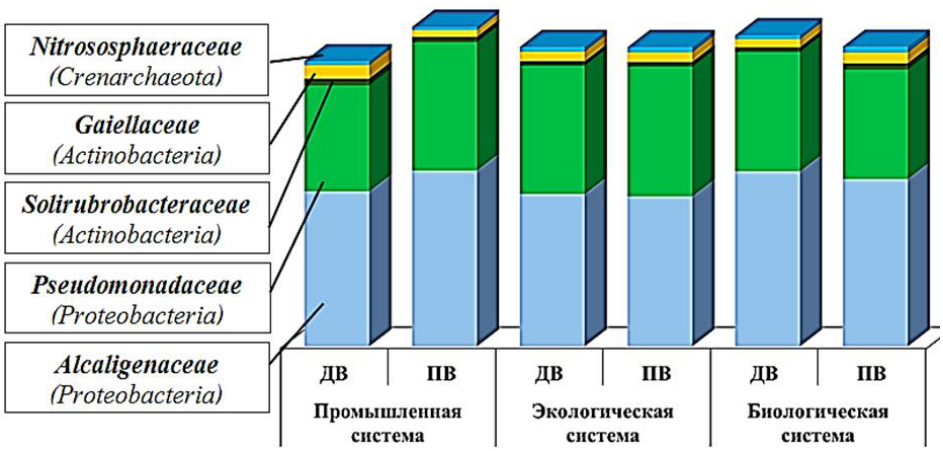


**Рис. 1. Распределение доминирующих таксонов прокариот чернозема при разных системах земледелия (ДВ – дифференцированное возделывание, ПВ – поверхностное возделывание)**

Более существенная вариабельность распределения в вариантах опыта наблюдалась среди субдоминирующих представителей микробиома (рис. 2).

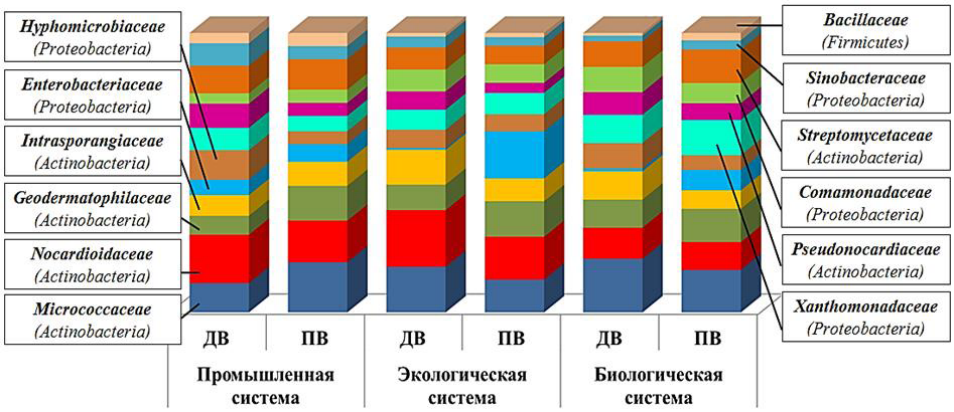


**Рис. 2. Распределение субдоминирующих таксонов прокариот чернозема при разных системах земледелия (ДВ – дифференцированное возделывание, ПВ – поверхностное возделывание)**

При этом, в биологической системе земледелия, наблюдалось снижение представленности *Nocardioidaceae* и повышение *Streptomycetaceae* в сравнении с промышленной и экологической системами. Также, в вариантах с приоритетным применением органических удобрений, возрастало число представителей семейств *Xanthomonadaceae*, *Comamonadaceae* и наблюдалось снижение части представленности *Bacillaceae*.

Также стоит отметить, что часть минорных видов прокариот, представленность каждого из которых не превышала 0,1 % суммарно, в зависимости от варианта опыта, составляла – 16,3–25,2 %, что свидетельствует об их значительном вкладе в формирование общего метагеномного биоразнообразия.

Оценка биоразнообразия и структуры общего метагенома почвенных прокариот даёт возможность перейти к изучению генетического полиморфизма функционально значимых доминирующих таксонов. Была построена филогенетическая дендрограмма доминирующих и субдоминирующих бактериальных таксонов, которая отображает топологию распределения и эволюционное расстояние между основными представителями метагенома прокариот чернозема типичного в агроценозе пшеницы озимой (рис. 3).

Топология распределения ОТЕ свидетельствует о наличии двух основных кластеров, которые объединяют представителей фил *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Таким образом, выявляется генетическое родство и связь основных идентифицированных представителей прокариот исследуемой почвы. Абсолютные доминанты представителей родов *Achromobacter* и *Pseudomonas* находятся в одном кластере, но в разных подкластерах. Это свидетельствует о том, что между ними имеется определённое генетическое расстояние, которое обусловлено эволюционными процессами формирования микробиома. Кластер филы *Actinobacteria* включал два подкластера, в которые по генетическому родству попали представители семейств: в 1 – *Geodermatophilaceae*,

*Streptomycetaceae*, *Micrococcaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Nocardioidaceae*; 2 – *Gaiellaceae*, *Solirubrobacteraceae*.

Представители филы *Chloroflexi* были отнесены в отдельный кластер, который имеет достаточно отдаленные филогенетические связи.

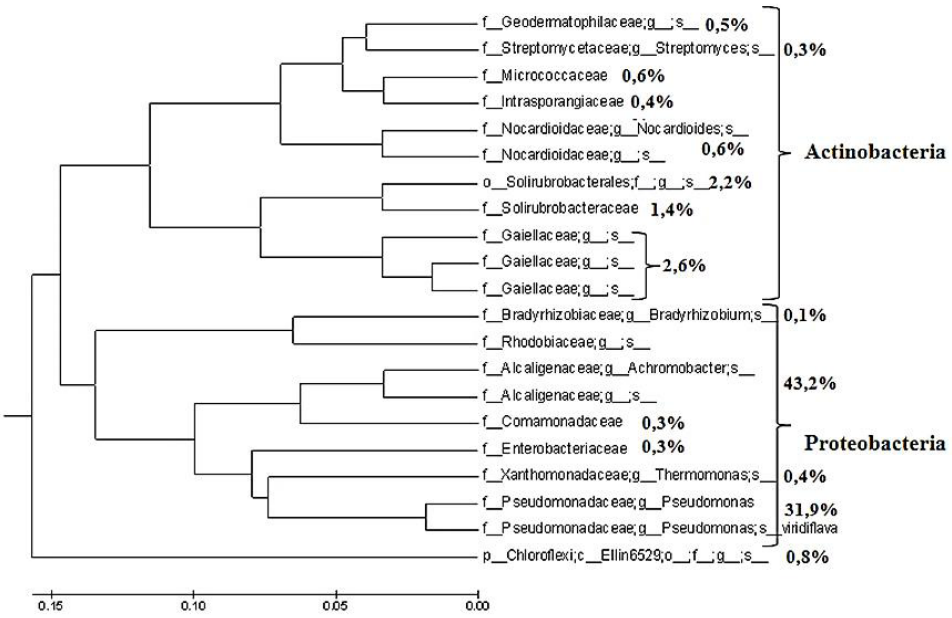


**Рис. 3. Генетический полиморфизм функционально значимых таксонов метагенома прокариот чернозема типичного в агроценозе озимой пшеницы (дендрограмма сформирована на основе данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК доминирующих прокариот; проценты отображают часть каждого таксона в общем метагеноме)**

Таким образом, использование метода пиросеквенирования позволило на новом уровне оценить биоразнообразие и генетический потенциал прокариотного комплекса чернозема типичного при разных системах земледелия. В результате исследований был выявлен метагеном, структура распределения и представленность отдельно взятых ОТЕ прокариот почвы в агроценозе пшеницы озимой. Метагеномный анализ позволил выявить реальное генетическое разнообразие (1708 ОТЕ), идентифицировать 335 прокариотных таксонов на уровнях от домена до рода. Это дало возможность изучить таксономическую структуру прокариотного биома, выявить наиболее выраженные доминанты (*Achromobacter* и *Pseudomonas*), субдоминанты и минорные таксоны. Также выявление значительного количества неклассифицированных ОТЕ свидетельствует о возможности локализации и изучения новых генотипов, некультивируемых на элективных питательных средах классическими методами микробиологии.

По результатам метагеномного анализа появляется уникальная возможность детекции функционально значимых для почвенных агроэкосистем полиморфизмов прокариот, и, таким образом, изучать их генетический потенциал и филогентические связи, что открывает перспективы для исследований трофических взаимосвязей прокариотных комплексов, составляющих биологические системы почвы.

*М.В. Патика, О.Ю. Колодяжний, І.І. Ібатуллін*

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,*
*вул. Героїв Оборони, 13, Київ, 03041, Україна*

## ОЦІНКА МЕТАГЕНОМУ ТА ДЕТЕКЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНО ЗНАЧУЩИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ ПРОКАРІОТ ҐРУНТУ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ПІРОСЕКВЕНУВАННЯ

Р е з ю м е

У роботі проведено оцінку метагеному і функціонально значущих філогенетичних і таксономічних поліморфізмів прокаріот чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої з використанням методу піросеквенування. Було виявлено 1708 операційних таксономічних одиниць і 335 таксонів прокаріот. Встановлено, що структура метагеному прокаріот чорнозему типового включала представників 2 архейних і 22 бактеріальних філ, абсолютні домінанти серед яких належали до *Proteobacteria* – 79,6 % і *Actinobacteria* – 12,9 %. Поліморфізм представленості прокаріотних таксонів спостерігали на рівні родин, домінуючими при цьому були: *Alcaligenaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Solirubrobacteraceae*, *Gaiellaceae*, *Nitrososphaeraceae.* Показано філогенетичні зв'язки між основними представниками метагеному прокаріот чорнозему типового в агроценозі озимої пшениці. Таким чином, використання методу піросеквенування, окрім оцінки структури і різноманіття, відкриває перспективи для дослідження функціональної складової метагеному прокаріот ґрунту.

К л ю ч о в і  с л о в а: метагеном, прокаріоти, піросеквенування, таксономічна структура, функціонально значущі поліморфізми, чорнозем типовий.

*N.V. Patyka, A.Yu. Kolodyazhnyi, I.I. Ibatullin*

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,*
*13 Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine*

## THE EVALUATION OF METAGENOME AND DETECTION OF FUNCTIONALLY SIGNIFICANT POLYMORPHISMS OF PROKARYOTES OF SOIL BY METHOD OF PYROSEQUENCING

S u m m a r y

It was evaluated the metagenome and functionally significant phylogenetic and taxonomic polymorphisms of prokaryotes of typical chernozem in agrocenoses of winter wheat by the method of pyrosequencing. Have been received 1708 operational taxonomic units and identified 335 taxons of prokaryotes. It was established, that the structure of prokaryotes metagenome of typical chernozem includes the representatives of the 2 *Archaea* and 22 *Bacteria* phylums, and absolutely dominants among them were *Proteobacteria* – 79.6 % and *Actinobacteria* – 12.9 %. The polymorphism of representation of prokaryotic taxons was observed at the level of families, and the dominants were *Alcaligenaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Solirubrobacteraceae*, *Gaiellaceae*, *Nitrososphaeraceae*. It is shown phylogenetic links between the main representatives of prokaryotes' metagenome of typical chernozem in agrocenoses of winter wheat. Thus, the use of pyrosequencing, in addition to estimation of structure and diversity, opens new perspectives for the study of functional component of prokaryotes' metagenome of soil.

K e y  w o r d s: metagenome, prokaryotes, pyrosequencing, taxonomic structure, functionally significant polymorphisms, typical chernozem.

1. *Гадзало Я.М., Патыка Н.В., Заришняк А.С.* Агробиология ризосферы растений: монография. – К.: Аграрна наука, 2015. – 386 с.
2. *Колодяжний О.Ю., Андронов Є.Є., Патика М.В.* Молекулярно-біологічне оцінювання прокаріотного комплексу чорнозему типового за вирощування пшениці озимої // Збірник наукових праць ННЦ «Інститут землеробства НААН» – 2014. – № 1–2. – С. 61–67.
3. *Колодяжний О.Ю., Патика М.В.* Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства // Вісник Полтавської державної аграрної академії – 2014. – № 2 (73). – С. 26–33.
4. *Патика М.В., Патика Т.І., Григорюк І.П., Круглов Ю.В.* Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму метагеномних нуклеотидних послідовностей ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* і прокаріотного комплексу грунтів // Доп. НАН України. – 2012. – № 1. – С. 164–170.
5. *Патыка Н.В., Бородай В.В., Житкевич Н.В., Хоменко Е.В., Гнатюк Т.Т., Колтунов В.А., Патыка В.Ф.* Влияние биопрепаратов на динамику численности бактерий и фитопатогенных грибов в агроэкосистеме картофеля // Мікробіол. журн. – 2012. – Т. 74 – № 2. – С. 28–35.
6. *Патыка Н.В., Круглов Ю.В., Бердников А.М., Патыка В.Ф.* Роль *Linum usitatissimum l.* в формировании микробных сообществ подзолистых почв // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 1. – С. 59–70.
7. *Патыка Н.В., Круглов Ю.В., Патыка В.Ф.* Особенности филогенетических профилей прокариотических микроорганизмов подзолистых почв // Филиология и биохимия культ. растений – 2009. – Т. 41.– № 3. – С. 248–254.
8. *Патыка Т.И., Патыка Н.В., Патыка В.Ф.* Филогенетические взаимосвязи серологических вариантов *Bacillus thuringiensis* // Biopolymers and Cell. – 2009. – 25, № 3. – С. 240–244.
9. *Танчик С.П., Демідов О.А., Манько Ю.П.* Екологічна система землеробства в Лісостепу України. Методичні рекомендації для впровадження у виробництво – К: НУБіП України, 2011. – 39 с.
10. *Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. – 2009. – N 37. – P. 141–145.
11. *Ganley A., Kobayashi T.* Total rDNA repeat variation revealed by whole genome shotgun sequence data// Genome Research. – 2007. – N 17. – P. 184–191.
12. *Kuczynski J., Stombaugh J., Walters W.A., González A., Caporaso J.G., Knight R.* Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities // Curr. Protoc. In Bioinformatics – 2012. DOI: 10.1002/0471250953.bi1007s36
13. *Kunin V., Copeland A., Lapidus A., Mavromatis K., Hugenholtz P.* A Bioinformatician's Guide to Metagenomics // Microbiology and molecular biology reviews. – 2008. – V. 72. – N 4. – P. 557–578.
14. *Ronaghi M.* Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis // Methods Mol. Biol. – 2004. – V. 255. – P. 211–219.
15. *Taran N.Y., Gonchar O.M., Lopatko K.G., Batsmanova L.M., Patyka M.V., Volkogon M.V.* The effect of colloidal solution of molybdenum nanoparticles on the microbial composi-

tion in rhizosphere of *Cicer arietinum L.* // Nanoscale Res. Lett. – 2014 – 9 (1): 289 – doi: 10.1186/1556-276X-9-289.
16. *Tringe S.G., Rubin E.M.* Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples // Nature reviews: Genetics. – Nature Publishing Group, 2005. – Vol. 6. – P. 805–814.
17. *Wooley J.C.* Metagenomics: Facts and artifacts, and computational challenges // Journal of computer science and technology. – 2010. – Vol. 1. – N 25. – P. 71–81.

Отримано 21.12.2015