

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОБНЫХ
СООБЩЕСТВ В ПОЧВАХ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПО ДАННЫМ
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ
БИБЛИОТЕК ГЕНА 16S-rРНК*

Е.Л. ЧИРАК¹, Е.В. ПЕРШИНА¹, А.С. ДОЛЬНИК², О.В. КУТОВАЯ³,
Е.С. ВАСИЛЕНКО³, Б.М. КОГУТ³, Я.В. МЕРЗЛЯКОВА¹, Е.Е. АНДРОНОВ¹

Особенности почвенного микробиома могут послужить универсальным и очень чувствительным индикатором состояния почвы, в том числе при оптимизации и биологизации систем земледелия. Однако для применения такого подхода необходимо предварительно изучить состав микробиомов, приуроченных к различным типам почв. Ранее подобные таксономические исследования представляли собой трудновыполнимую задачу и требовали больших материальных и временных затрат. С внедрением в молекулярную экологию методов секвенирования нового поколения стало возможным увеличить число не только выявляемых видов микроорганизмов, но и исследуемых местообитаний. Мы выполнили первичный анализ микробных сообществ с использованием пиросеквенирования почвенного метабенома. Для проведения исследования была создана коллекция почв, отобранных в различных регионах России (20 образцов), а также в Крыму (Украина, 1 образец). В микробном сообществе доминировали бактерии из фил *Proteobacteria* (до 59,3 %), *Actinobacteria* (до 55,4 %), *Acidobacteria* (до 26,5 %), *Verrucomicrobia* (до 13,6 %), *Bacteroidetes* (до 10,5 %), *Firmicutes* (до 8,2 %), *Gemmatimonadetes* (до 6,9 %), *Chloroflexi* (до 5,7 %) и археи из филы *Crenarchaeota*. Сравнение таксономической структуры микробных сообществ указывает на то, что физико-химические факторы, такие как кислотность/щелочность и увлажненность территории, влияют на биоразнообразие прокариот в большей степени, чем другие (например, тип почвы или место отбора проб). Так, в почвах южных регионов, характеризующихся более низким гидротермическим коэффициентом (ГТК), отмечено преобладание актинобактерий, в то время как в северных почвах с высоким ГТК преобладали протеобактерии. Для почв с низким рН характерно увеличение доли ацидобактерий.

Ключевые слова: почва, ампликонные библиотеки, 16S-rРНК, микробиом, таксономия.

Keywords: soil, amplicon library, 16S rRNA, microbiome, taxonomy.

До самых недавних пор определение таксономического состава микробного сообщества представляло собой трудноразрешимую задачу, требующую больших материальных и временных затрат. Трудоемкость процедур клонирования и последующего секвенирования нуклеотидных последовательностей ограничивала число не только выявляемых видов микроорганизмов, но и исследуемых местообитаний (1). Ситуация существенно изменилась с внедрением в молекулярную экологию методов нового поколения, в частности технологии пиросеквенирования (2, 3). Применение этих подходов повысило производительность секвенирования с сотен (метод Сэнджера) до нескольких тысяч нуклеотидных последовательностей, что способствовало максимально точному описанию даже таких сложных многокомпонентных систем, как почвенное микробное сообщество. В настоящее время реализуется несколько международных проектов, направленных на характеристику глобального микробного сообщества Земли. Один из них — Earth Microbiome Project (<http://www.earthmicrobio-me.org/>), в рамках которого уже собрана информация о таксономической структуре микробиомов различных экологических ниш, полученная с использованием секвенаторов нового поколения. В рамках указанного проекта к настоящему времени проанализировано более 9000 образцов, или свыше 800 млн нук-

* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, ГК № 16.512.11.2132, Программы поддержки фундаментальных исследований по приоритетным направлениям Санкт-Петербургского государственного университета и РФФИ 12-04-01371-а.

леотидных последовательностей. Однако по России в упомянутой базе данных имеется лишь около десятка образцов, относящихся к вечной мерзлоте. Настоящая работа призвана восполнить существующий пробел. Поставленная задача особенно важна в связи с тем, что на территории России представлено фактически все известное почвенное разнообразие, и в этом отношении она может считаться одной из самых интересных экспериментальных площадок планеты. Кроме того, исследование почвенных микробиомов с использованием современных приемов секвенирования весьма перспективно с практической точки зрения, так как открывает возможности для создания совершенно новых подходов к оптимизации технологий земледелия. Основой таких подходов может стать использование особенностей почвенного микробиома как универсального и очень чувствительного индикатора состояния почвы.

Реализация подобных проектов должна начинаться с обзорного исследования почвенных микробиомов, приуроченных к различным типам почв. Именно эта цель была поставлена в нашем исследовании.

Методика. Для проведения экспериментов создали коллекцию проб, представляющих наиболее распространенные почвенные типы (всего 20 образцов). Пробы почвы отбирали в разных регионах России и в Украине в сентябре 2011 года, после чего образцы транспортировали в лабораторию, где хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ДНК выделяли из 0,5 г замороженной почвы после механического разрушения с использованием стеклянных шариков в экстрагирующем буфере, состоящем из следующих компонентов: 350 мкл раствора А (натрий-фосфатный буфер — 200 мМ; изотиоцианат гуанидина — 240 мМ; рН 7,0), 350 мкл раствора Б (Трис-НСl — 500 мМ; SDS — 1 % по массе к объему; рН 7,0) и 400 мкл смеси фенола с хлороформом (1:1). Разрушение образца проводили в течение 1 мин при максимальной мощности на приборе FastPrep 24 («MP Medicals», США). Полученный препарат центрифугировали при максимальной скорости в течение 5 мин. Водную фазу отбирали и повторно экстрагировали хлороформом. ДНК осаждали, добавляя равный объем изопропилового спирта. После центрифугирования осадок промывали 70 % этанолом и растворяли в воде при $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течении 5-10 мин. Очистку ДНК проводили с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле с последующим выделением ДНК из геля методом сорбции на оксиде кремния (4, 5).

При конструировании и секвенировании ампликонных библиотек очищенный препарат ДНК (по 10-15 нг) использовался в качестве матрицы в реакции ПЦР (температурный профиль: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 30 с, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 30 с, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 30 с; всего 30 циклов) с добавлением полимеразы Epcyclo («Евроген», Россия) и универсальных праймеров к вариабельному участку V4 гена 16S-рРНК — F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACT-ACVSGGGTATCTAAT) (6). Кроме того, в праймеры вводили олигонуклеотидные идентификаторы для каждой пробы (20 идентификаторов) и служебные последовательности, необходимые для пиросеквенирования по протоколу фирмы «Roche» (Швейцария). Подготовку проб и секвенирование выполняли на приборе GS Junior («Roche», Швейцария) согласно рекомендациям производителя.

Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек осуществляли с помощью программы QIIME (7). В процессе анализа выполнялись следующие действия: разделение библиотек по идентификаторам, проверка качества секвенирования и фильтрация

нуклеотидных последовательностей, объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с использованием 97 % порога сходства, выравнивание нуклеотидных последовательностей методом Uclust, построение матрицы генетических дистанций и филогенетического древа по методу Fasttree. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с использованием банка данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). На основе результатов анализа представленности ОТЕ в пробах рассчитывали индексы биоразнообразия Шеннона и ChaoI: $H = -\sum p_i \ln p_i$ (p_i — доля i -го вида в сообществе), $S_{est}(ChaoI) = S_{obs} + a^2/2b$ (S_{est} — оцениваемое число ОТЕ, S_{obs} — наблюдаемое число ОТЕ, a — число ОТЕ, выявленных один раз, b — число ОТЕ, выявленных ровно два раза). Кроме того, выполняли тест Rarefaction, характеризующий динамику накопления ОТЕ в зависимости от числа секвенированных последовательностей, а также кластерный анализ образцов с применением метода UPGMA и определением значимости кластеров по алгоритму Bootstrap.

Результаты. Образцы почвы имели разное происхождение (табл. 1).

1. Коллекционное описание почвенных образцов, отобранных в разных географических точках (Россия, Украина; время отбора — сентябрь 2011 года)

Организация	Место отбора	№ пробы	Обозначение	Почвенный таксон	Биогеоценоз	Координаты GPS
Прикаспийский НИИАЗ, г. Астрахань	Астраханская обл.	19	BURSOL19	Бурая солонцеватая	Целина	N 47°88'7.49" E 46°12'2.94"
Прикаспийский НИИАЗ, г. Астрахань	Астраханская обл.	37	SOLONC37	Солонец мелкий солончаковый	Целина	N 47°88'5.07" E 46°12'6.01"
Воронежский НИИСХ	Воронежская обл.	59	CHERNZ59	Чернозем типичный	Залежь косимая	N 51°09'16.24" E 40°47'09.08"
Воронежский НИИСХ	Воронежская обл.	86	CHERNZ86	Лугово-черноземная	Залежь с 1892 года	N 51°09'16.24" E 40°47'09.08"
Центральный музей почвоведения им. В.В. Докучаева, г. Санкт-Петербург	Ленинградская обл.	108	PODZOL108	Подзол	Залежь	N 60°32'33.45" E 33°9'6.75"
ВНИИМЗ, г. Тверь, агроландшафтный стационар «Губино»	Тверская обл.	124	PODZOL124	Дерново-подзолистая	Луг у леса	N 56°46'25.38" E 36°04'50.61"
Ставропольский НИИСХ, г. Михайловск	Ставропольский край	187	CHERNZ187	Чернозем обыкновенный	Целина	N 56°25'24.40" E 59°06'40.25"
Татарский НИИСХ, г. Казань	Республика Татарстан	195	SERLES195	Серая лесная	Залежь	N 55°40'15" E 52°08'28"
Богдинская НИАГЛОС, Харабалинский р-н	Астраханская обл.	202	POJMEN202	Пойменная аллювиально-слоистая	Целина	N 47°24'20.38" E 47°14'50.47"
Новосильская опытная станция, г. Мценск	Орловская обл.	235	SERLES235	Серая лесная	Луг	N 53°17' E 33°33'
ВНИИОУиУТ, Судогодский р-н	Владимирская обл.	253	PODZOL253	Дерново-сильно-подзолистая	Смешанный лес	N 56°03'7" E 40°29'52"
ВНИИЗиЗПЭ, г. Курск	Курская обл.	279	CHERNZ279	Чернозем типичный	Центрально-Черноземный заповедник им. В.В. Алехина	N 51°34'27.8" E 36°05'67.2"
Клетский опытно-опорный пункт ВНИАЛМИ	Волгоградская обл.	294	KASHTM294	Темно-каштановая	Целина	N 49°13'29" E 42°56'32"
ВНИАЛМИ, г. Волгоград	Волгоградская обл.	312	KASHSV312	Светло-каштановая	Залежь	N 48°38'49" E 44°22'57"
Калмыцкая научно-исследовательская лесная опытная станция	Республика Калмыкия	326	KASHSV326	Светло-каштановая солонцеватая	Целина	N 46°17'09" E 44°15'11"
ФГУП Котласское	Архангельская обл.	345	SUGLSV345	Дерновая суглинистая	Залежь	N 61°8'50" E 46°32'55"
ФГУП Холмогорское	Архангельская обл.	357	ALLDER357	Аллювиальная дерновая	Пойма, сенокос	N 63°45'17" E 41°56'19"
ФГУП Архангельское	Архангельская обл.	384	ALLDER384	Аллювиальная дерновая	Центральная пойма, залежь, сенокос	N 64°30'13.0" E 40°26'45.1"
КИАПП, Крым, пос. Клепинино	Крым	399	KRASZM399	Чернозем южный	Целина	N 45°32'21.74" E 34°12'6.24"
Орловский ГАУ	Орловская обл.	404	SERLES404	Темно-серая лесная	Залежь	N 52°59'34.94" E 36°0'29.92"

Примечание. НИИАЗ — НИИ аридного земледелия, НИИСХ — НИИ сельского хозяйства, ВНИИМЗ — Всероссийский НИИ сельскохозяйственного использования мелиорированных земель, НИАГЛОС — Научно-исследовательская агролесомелиоративная опытная станция, ВНИИОУиТ — Всероссийский НИИ органических удобрений и торфа, ВНИИЗиЗПЭ — Всероссийский НИИ земледелия и защиты почв от эрозии, ВНИАЛМИ — Всероссийский НИИ агролесомелиорации, КИАПП — Крымский институт агропромышленного производства, ГАУ — государственный аграрный университет.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Используемые в работе праймеры были сконструированы на основе последовательностей гена 16S-рРНК как бактерий, так и архей, что позволяет проводить комплексный анализ прокариотного сообщества.

2. Число секвенированных последовательностей гена 16S-рРНК, операционных таксономических единиц (ОТЕ) и рассчитанные индексы биоразнообразия Шеннона и ChaoI для почвенных образцов из разных географических точек (Россия, Украина)

Образец	Индекс Шеннона (H)	Индекс ChaoI	Число ОТЕ	Секвенировано последовательностей
BURSOL19	8,48	1841	740,8	3857
SOLONC37	8,70	2068	824,2	4435
CHERNZ59	8,61	2365	830,0	4594
CHERNZ86	8,37	1927	759,2	4433
PODZOL108	7,45	1193	513,6	4101
PODZOL124	8,87	1926	857,9	2011
CHERNZ187	8,28	1662	697,3	2181
SERLES195	8,50	1775	735,9	3952
POJMEN202	8,09	1735	681,1	3877
SERLES235	8,84	2289	844,6	4113
PODZOL253	8,15	1681	693,6	4113
CHERNZ279	8,12	1696	733,6	5010
KASHTM294	8,29	1954	725,7	4209
KASHSV312	6,42	848	469,6	5029
KASHSV326	8,25	2034	729,6	3935
SUGLSV345	9,18	3422	1010,3	5704
ALLDER357	8,68	2210	815,4	4124
ALLDER384	7,77	1139	565,5	2783
KRASZM399	7,47	1370	535,9	3218
SERLES404	8,62	2287	837,7	5089

Примечание. Число ОТЕ указано в расчете на 2011 сиквенсов.

Всего было секвенировано 100 589 последовательностей, из которых после процедуры проверки качества (QUALITY > 25) и фильтрации для дальнейшего анализа отобрали 62 977 последовательностей длиной 270 нуклеотидов. Число последовательностей в каждой пробе варьировало от 2011 до 5704 (в среднем 4059,5) (табл. 2). Общее число ОТЕ (последовательности гена 16S-рРНК, имеющие 97 % сходства, что примерно соответствует таксономической категории вида) в пробах составило 10 891. Их объединили в 42 филы (рис. 1, А, см. табл. 2) и 350 семейств (см. рис. 1, Б, табл. 2). Таксономическую принадлежность значительной части последовательностей не удалось установить как на уровне вида и рода, так и на более высоких таксономических уровнях, включая филы. Наличие неатрибутируемых (НА) последовательностей обусловлено неполнотой имеющихся баз данных и характерно для метагеномных исследований.

На уровне доменов преобладали бактерии (93,3-99,9 %), доля архей оказалась значительно ниже (от 0,01 % в пробе PODZOL253 до 6,7 % — в KASHSV326). В ряде образцов имелись нуклеотидные последовательности, не атрибутируемые на уровне домена. Качественный состав бактериальных и археотных фил был сходным для всех рассматриваемых образцов. Положение доминирующих групп бактерий занимали представители фил *Proteobacteria* (до 59,3 %), *Actinobacteria* (до 26,5 %), *Verrucomicrobia* (до 13,6 %), *Bacteroidetes* (до 10,5 %), *Firmicutes* (до 8,2 %), *Gemmatimonadetes*

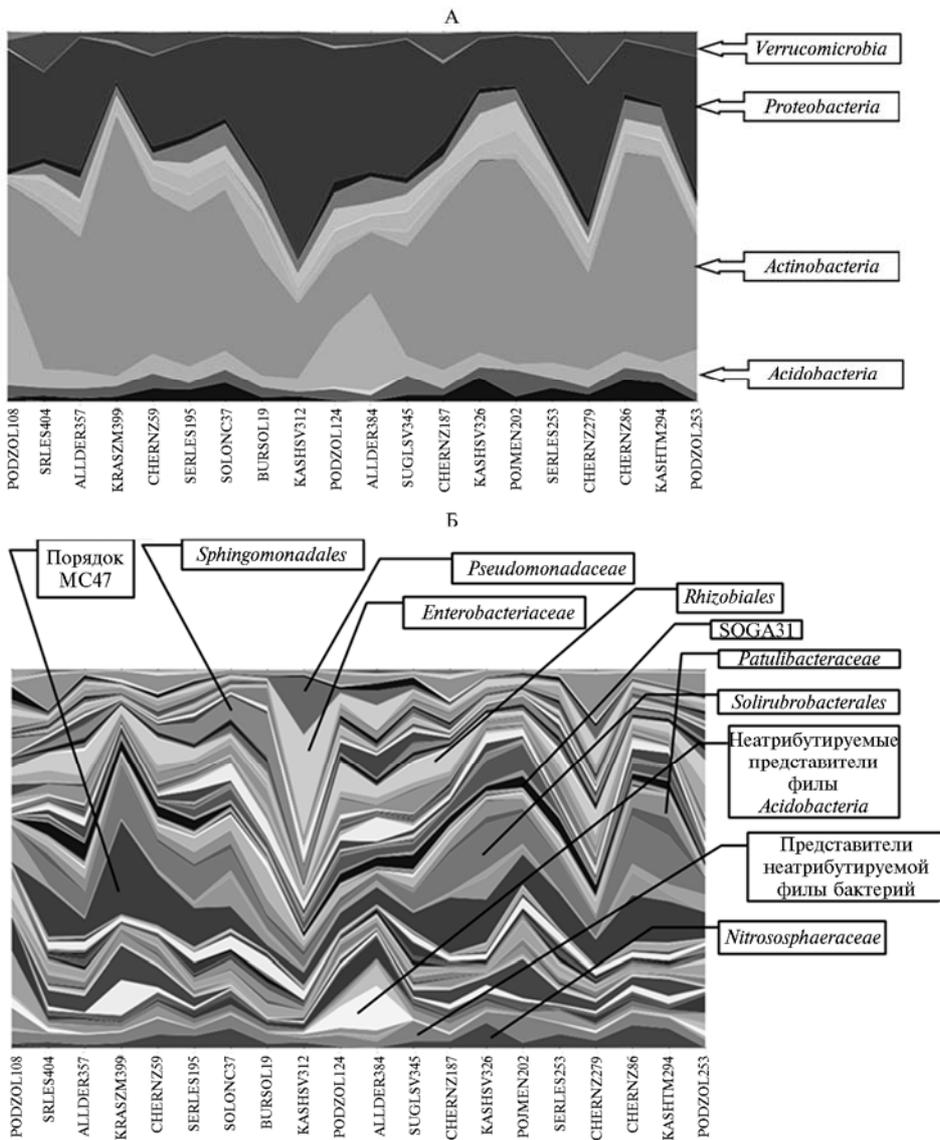


Рис. 1. Представленность фил (А) и семейств (Б) микроорганизмов (по данным секвенирования последовательностей гена 16S-рРНК) в почвенных образцах из разных географических точек (Россия, Украина; отмечены соответственно преобладающие филы и семейства).

(до 6,9 %), *Chloroflexi* (до 5,7 %). Археи были представлены филой *Crenarchaeota*. Подобное распределение весьма характерно для почвенных сообществ (8, 9). Решающую роль при сравнении таксономической структуры микробного сообщества в почвенных образцах играет соотношение бактериальных фил. Так, представители филы *Actinobacteria* заметно увеличивали численность в образцах KRASZM399, SOLONC37, KASHSV326, POJMEN202, CHERNZ86, KASHTM294 и KASHSV326. Все эти образцы были отобраны на территории южных регионов России и в Крыму (см. табл. 1, рис. 2), которые характеризуются наличием длительного засушливого периода. Поэтому доминирование актинобактерий в указанных образцах вполне объяснимо и может быть связано с их повышенной устойчивостью к низкому содержанию влаги в среде. Интересно, что в упомянутый список не попали еще два «южных» образца — KASHSV312 и CHERNZ279 (см. табл. 1, рис. 2), в которых актинобактерии оказались в значительной степени

3. Представленность фил и семейств микроорганизмов в совокупном метагеноме (по данным секвенирования последовательностей гена 16S-рРНК) в почвенных образцах из разных географических точек (Россия, Украина)

Таксономическая группа	Доля, %	Таксономическая группа	Доля, %
Ф и л ы			
<i>Actinobacteria</i>	39,0	<i>Euryarchaeota</i>	0,0
<i>Proteobacteria</i>	27,8	<i>Chlorobi</i>	0,0
<i>Acidobacteria</i>	7,6	<i>Fusobacteria</i>	0,0
<i>Verrucomicrobia</i>	3,8	<i>Spirochaetes</i>	0,0
<i>Chloroflexi</i>	3,6	<i>Tenericutes</i>	0,0
<i>Gemmatimonadetes</i>	3,6	<i>Thermi</i>	0,0
<i>Firmicutes</i>	3,2	ZB2	0,0
Неидентифицированная фила	2,9	<i>Deferribacteres</i>	0,0
<i>Bacteroidetes</i>	2,8	<i>Caldiserica</i>	0,0
<i>Crenarchaeota</i>	2,4	<i>Spirochaetes</i>	0,0
<i>Planctomycetes</i>	1,8	<i>Chrysiogenetes</i>	0,0
<i>Nitrospirae</i>	0,2	<i>Thermotogae</i>	0,0
SPAM	0,2	<i>Aquificae</i>	0,0
Неидентифицированный домен	0,1	<i>Synergistetes</i>	0,0
AD3	0,1	<i>Dictyoglomi</i>	0,0
<i>Armatimonadetes</i>	0,1	<i>Elusimicrobia</i>	0,0
CCM11b	0,1	OP11	0,0
<i>Chlamydiae</i>	0,1	<i>Fibrobacteres</i>	0,0
<i>Cyanobacteria</i>	0,1	<i>Lentisphaerae</i>	0,0
<i>Elusimicrobia</i>	0,1	<i>Thermodesulfobacteria</i>	0,0
WPS2	0,1	SR1	0,0
WS3	0,1		
С е м е й с т в а			
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	3,3	<i>Koribacteraceae</i>	0,6
<i>Spartobacteriaceae</i>	2,9	<i>Geodermatophilaceae</i>	0,6
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,8	<i>Acetobacteraceae</i>	0,6
<i>Nitrososphaeraceae</i>	2,4	AKIW874	0,5
<i>Solirubrobacteraceae</i>	2,2	<i>Haliangiaceae</i>	0,5
<i>Sphingomonadaceae</i>	2,1	<i>Intrasporangiaceae</i>	0,4
<i>Solibacteraceae</i>	1,9	<i>Microbacteriaceae</i>	0,4
<i>Gemmatimonadaceae</i>	1,9	<i>Micromonosporaceae</i>	0,4
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	1,8	<i>Mycobacteriaceae</i>	0,4
<i>Nocardioideaceae</i>	1,7	<i>Pseudonocardiaceae</i>	0,4
<i>Pseudomonadaceae</i>	1,6	<i>Flexibacteraceae</i>	0,4
<i>Rubrobacteraceae</i>	1,5	<i>Bacillaceae</i>	0,4
<i>Patulibacteraceae</i>	1,2	<i>Caulobacteraceae</i>	0,4
<i>Rhodospirillaceae</i>	1,1	<i>Oxalobacteraceae</i>	0,4
EB1017	1,0	CL500-29	0,3
<i>Syntrophobacteraceae</i>	1,0	<i>Iamiaceae</i>	0,3
<i>Sinobacteraceae</i>	0,9	<i>Paenibacillaceae</i>	0,3
<i>Acidobacteriaceae</i>	0,8	<i>Burkholderiaceae</i>	0,3
<i>Streptomycetaceae</i>	0,8	<i>Comamonadaceae</i>	0,3
<i>Xanthomonadaceae</i>	0,8	<i>Frankiaceae</i>	0,2
<i>Micrococcaceae</i>	0,7	FFCH4570	0,2
<i>Gemmataceae</i>	0,7		

вытесненными из состава сообщества представителями филы *Proteobacteria* (см. рис. 1, А). Если исключить названные образцы из рассмотрения, то при анализе таксономической структуры можно обнаружить тенденцию к преобладанию филы *Actinobacteria* в южных и *Proteobacteria* — в северных регионах. Стоит отметить, что в южных регионах возрастает и численность представителей филы *Firmicutes* (KASHSV326 и POJMEN202). Ярко выраженную тенденцию в изменении численности демонстрируют бактерии из филы *Acidobacteria*, которые распространены в основном в дерново-подзолистых почвах (PODZOL108, PODZOL124, ALLDER384, PODZOL253; см. рис. 1, А). Такое распределение, скорее всего, связано с низкими значениями pH подзолистых почв, поскольку высокая кислотность среды создает оптимальные условия для развития ацидобактерий (10). Полученные нами данные служат прекрасной иллюстрацией и дополнением к недавно проведенным экспериментам по изучению

распространения бактериальных фил в зависимости от физико-химических факторов среды, в которых было показано, что наиболее сильное влияние на почвенное сообщество оказывают влажность и кислотность/щелочность (11).

На уровне семейств мы наблюдали крайне сложную структуру сообщества с отсутствием четко выраженных доминирующих групп бактерий. Такие группы появлялись лишь в ряде образцов: например, в образце KASHSV 312 значительно увеличилась численность семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* (соответственно 26,43 % и 15,11 %), в образцах PODZOL124 и ALLDER 384 возростала доля не атрибутируемых на уровне семейства ацидобактерий, в образце KRASZM399 отмечалось повышение численности не атрибутируемых на уровне семейства бактерий из класса *Actinobacteria* (см. рис. 1, Б). И в то же время значительное число се-

мейств бактерий были достаточно равномерно представлены во всех типах почв — прежде всего, это не атрибутируемые на уровне семейства бактерии из порядка МС47 (*Actinobacteria*), семейства *Solirubrobacteriaceae*, *Patulibacteraceae* из порядка *Solirubrobacteriales* (*Actinobacteria*), различные семейства протеобактерий из порядков *Rhizobiales* и *Sphingomonadales*, а также семейства SOGA31 (*Chloroflexi*) и *Gemmatimonadaceae* (*Gemmatimonadetes*) (см. рис. 1, Б). Интересно, что похожий набор бактериальных семейств мы наблюдали при изучении засоленных почв Казахстана (12), о присутствии бактерий из ряда вышеупомянутых семейств в различных почвах также сообщают другие авторы (8). Описанная тенденция характерна и для архей: так, во всех почвах доминировали археи из семейства *Nitrososphaeraceae*. Повсеместное присутствие микроорганизмов этой группы можно объяснить их активным

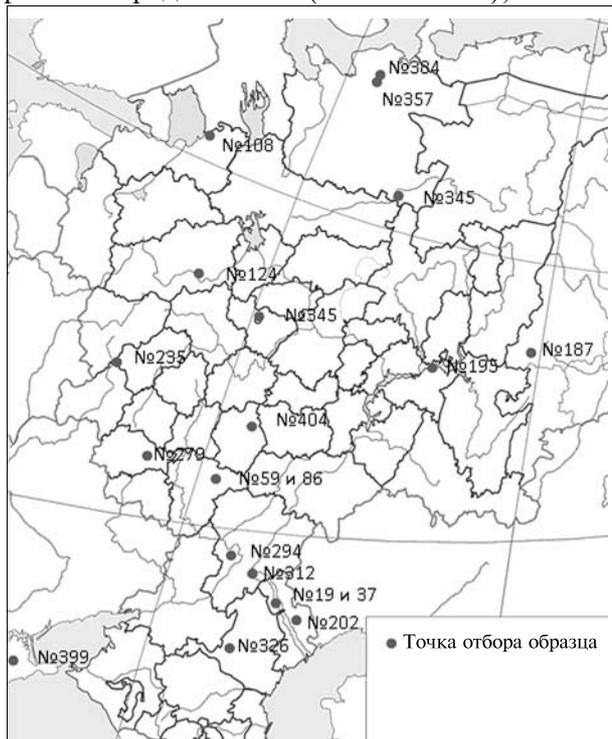


Рис. 2. Положение точек отбора изученных почвенных образцов в разных географических зонах (Россия, Украина).

участием в первых стадиях процесса нитрификации (13). Наличие таких бактериальных и археотных космополитов свидетельствует о присутствии в почве корового и аксессуарного компонентов почвенного микробиома (по аналогии с коровым и аксессуарными компонентами геномов микроорганизмов). Присутствие корового компонента еще раз указывает на высокую степень экологической пластичности почвенного сообщества, связанной как с адаптивными возможностями отдельных микроорганизмов, так и с «генетическим потенциалом» самой почвы, основанным, в частности, на поддержании в ней огромного пула внеклеточной ДНК (14).

Анализ α -разнообразия. Все изученные образцы подразделились на три группы (рис. 3), причем в первую входил только один обра-

зательное присутствие микроорганизмов этой группы можно объяснить их активным

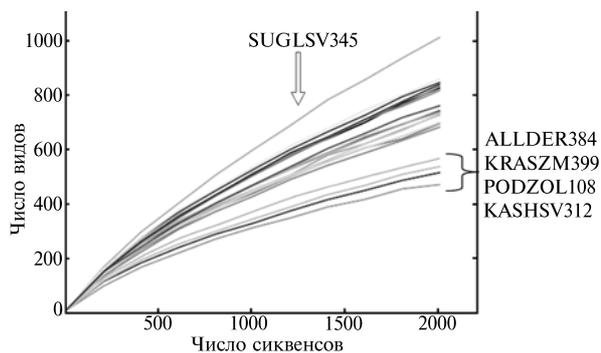


Рис. 3. Данные анализа α -разнообразия (по числу выявленных видов микроорганизмов) на основании результатов секвенирования последовательностей гена 16S-рРНК в почвенных образцах из разных географических точек (Россия, Украина).

зец SUGLSV345 с наибольшим разнообразием по всем критериям, в среднюю — почти все оставшиеся образцы, в том числе все серые лес-

ные почвы и все черноземы (в основном представлены необрабатываемые

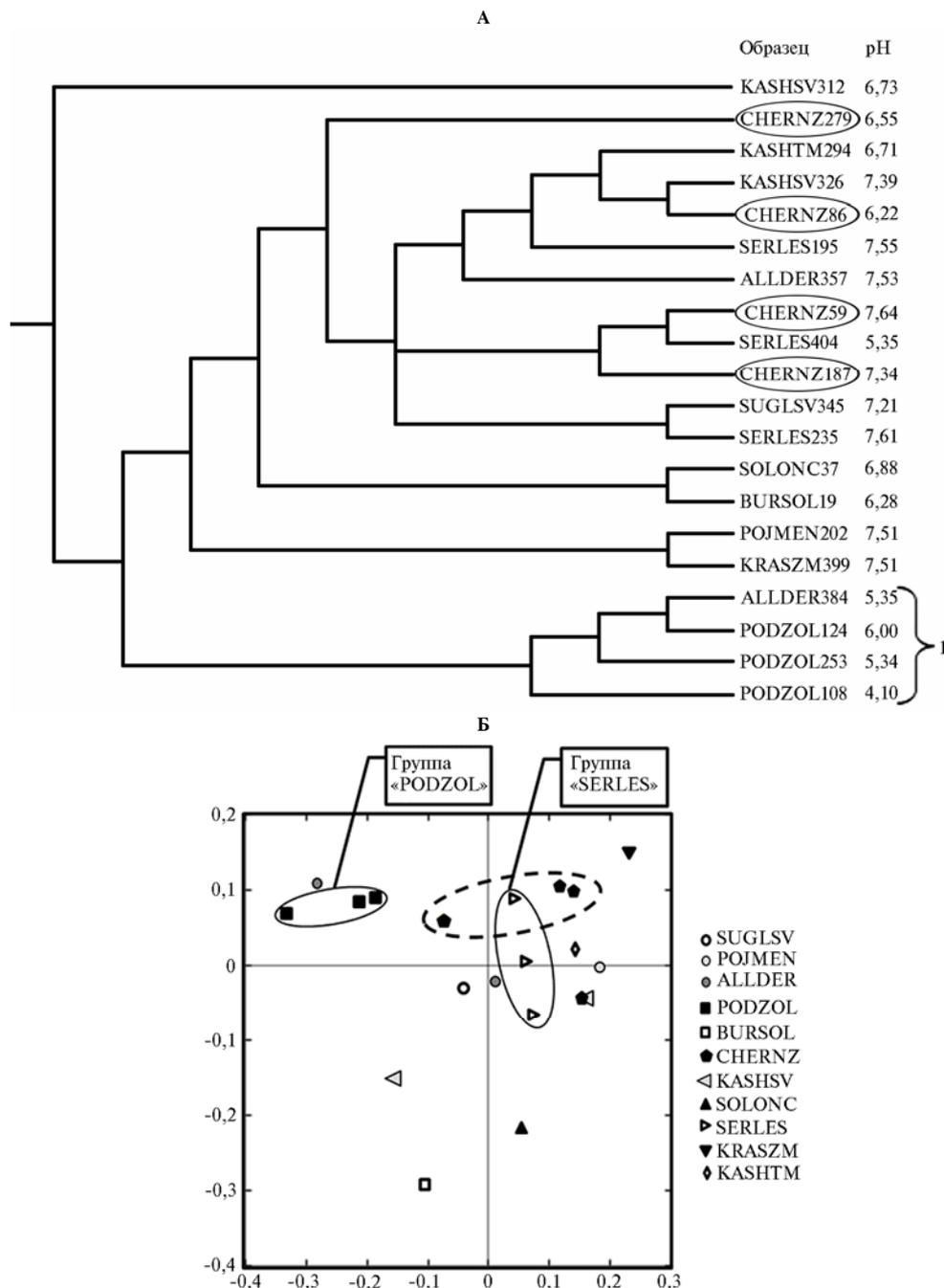


Рис. 4. Данные анализа β -разнообразия (на основании результатов секвенирования последовательностей гена 16S-rPHK) (А — дендрограмма родства, 1 — кластер 1; Б — двумерный график) в почвенных образцах из разных географических точек (Россия, Украина).

почвы, индекс Шеннона от 8,08 до 8,87) (см. табл. 2), и последнюю представляли образцы ALLDER384, KRASZM399, PODZOL108 и KASHSV312, в которых наблюдался сдвиг биоразнообразия в пользу одной из фил. В образцах ALLDER384 и PODZOL108 преобладали ацидобактерии, что, скорее всего, связано с повышенной кислотностью почвы. В образце KRASZM399 было выявлено максимальное число актинобактерий (70,48 % от общего числа бактерий). Образец KASHSV312 характеризовался наименьшим биоразнообразием: особенность этой почвы заключается в абсо-

лутном преобладании в ней бактерий из филы *Proteobacteria* (см. рис. 1, А). Существует мнение, что доминирование протеобактерий типично для нарушенных почвенных местообитаний (15).

Анализ β -разнообразия. Часть образцов группировались друг с другом в соответствии с типом почвы (PODZOL и SERLES) (рис. 4, Б), также сильной была тенденция в образовании кластеров в соответствии с определенными физико-химическими параметрами почвы, такими, например, как значения рН (см. рис. 4, А). В этой связи представляет интерес группа CHERNZ, в которой образцы с близким географическим положением (№ 59 и № 86) имели различную структуру микробиома (находились в разных кластерах), а два других образца, отобранных соответственно в южной и западной части страны (№ 59 и № 187), кластеризовались вместе (см. рис. 2, рис. 4, А). Вероятной причиной, определяющей в этом случае сходство или различие в структуре микробиомов, могут быть показатели рН — сходные (для образцов № 59 и № 187 рН соответственно 7,64 и 7,34) или, наоборот, различающиеся (для образцов № 59 и № 86 рН соответственно 7,64 и 6,22). Из приведенных фактов можно заключить, что на структуру микробиома оказывает воздействие не только (и не столько) тип почвы, сколько значения физико-химических показателей среды, в частности ее кислотность/щелочность. Полученный результат хорошо согласуется с данными ряда исследований, в которых авторам удалось показать, что рН среды — наиболее сильный, а иногда и единственный фактор, определяющий таксономический состав микробиома (16).

Таким образом, появление методов проточного секвенирования произвело существенный сдвиг в понимании истинных масштабов природного генетического разнообразия микробных сообществ и поставило перед почвенной микробиологией ряд принципиально новых научных проблем. В частности, по результатам проведенного нами исследования выявлена связь между абиотическими факторами (рН и увлажненность территории) и таксономическим составом микробного сообщества. Безусловно, для подтверждения обнаруженных закономерностей, а также включения в анализ всего спектра экологических факторов должны быть изучены несколько сотен образцов. Однако, как показали наши эксперименты, в состав почвенного микробиома входят сотни и даже тысячи видов, что затрудняет его анализ с использованием традиционных экологических подходов, а при большом числе тестируемых образцов делает его практически невозможным. Поэтому вместе с увеличением объемов выборки необходима разработка качественно новых методов анализа данных высокопроизводительного секвенирования, что позволило бы перейти от описательной экологии к функциональной. Очевидно, что требуется внедрение принципиально новых интегральных подходов, когда микробное сообщество рассматривается как некое функциональное единство, которое, с одной стороны, полностью зависит от условий среды, с другой — выступает основным фактором ее формирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wooley J.C., Ye Y. Metagenomics: Facts and artifacts, and computational challenges. *Journal of Computer Science and Technology*, 2010, 1(25): 71-81.
2. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2008, 9: 211-219.
3. Ronaghi M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. *Methods Mol Biol.*, 2004, 255: 211-219.
4. Malferrati G., Monferinin P., De Blasio P. et al. High-quality genomic DNA from human whole blood and mononuclear cells. *Bio Techniques*, 2002, 33(6): 1228-1230.

5. Андронов Е.Е., Петрова С.Н., Чижевская Е.П., Коростик Е.В., Ахтемова Г.А., Пинаев А.Г. Влияние внесения генетически модифицированного штамма *Sinorhizobium meliloti* Ach_5 на структуру почвенного сообщества микроорганизмов. Микробиология, 2009, 78(4): 525-534.
6. Bates S.T., Berg-Lyons J.G., Caporaso W.A. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. ISME J., 2010, 5: 908-917.
7. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, 2010, 7(5): 335-336.
8. Fierer N., Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS USA, 2006, 103: 626-631.
9. Nemergut D.R., Costello E.K., Hamady M. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. Environ. Microbiol. J., 2010, 1(10): 53-63.
10. Rousk J., Waath E., Brookes P.C. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J., 2010, 5: 1-12.
11. Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biol. Biochem., 2008, 40: 2407-2415.
12. Дольник А.С., Тамазян Г.С., Першина Е.В., Вяткина К.В., Порозов Ю.Б., Пинаев А.Г., Андронов Е.Е. Концепция универсальной таксономической системы бактерий: эволюционное пространство гена 16S-rPHK v. 1.0. Сельскохозяйственная биология, 2012, 5: 55-67.
13. Пиневиц А.В. Микробиология. СПб, 2007.
14. Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Harta M.M., Powell J.R., Klironomos J.N., Pauls K.P., Swanton C.J., Trevors J.T., Dunfield K.E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. Soil Biol. Biochem., 2007, 39: 2977-2991.
15. Spain A.M., Krumholz L.R., Elshahed M.S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. ISME J., 2009, 3: 992-1000.
16. Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75(15): 5111-5120. doi: 10.1128/AEM.00335-09.

¹ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
196608 г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: eeandr@gmail.com;

²Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 г. Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский просп., 28,
e-mail: alexander.dolnik@gmail.com;

³Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии,
119017 г. Москва, Пыжевский пер., 7,
e-mail: langobard@mail.ru.

Поступила в редакцию
9 августа 2012 года

TAXONOMIC STRUCTURE OF MICROBIAL ASSOCIATION IN DIFFERENT SOILS INVESTIGATED BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING OF 16S-rRNA GENE LIBRARY

*E.L. Chirak¹, E.V. Pershina¹, A.S. Dol'nik², O.V. Kutovaya³, E.S. Vasilenko³,
B.M. Kogut³, Ya.V. Merzlyakova¹, E.E. Andronov¹*

S u m m a r y

The features of soil microbiome may be an universal and very sensitive indicator of soil state used for optimization and biologization of agriculture systems. However, this approach to the matter requires a preliminary analysis of microbiomes composition in different types of soils. An analogical taxonomic investigations presented difficult task formerly and took considerable material and time expenditures. The introduction to molecular ecology of the new progeny methods of sequencing permits to increase both a number of revealed microorganism species and analyzed ecotops. The authors made the primary analysis of microbial associations with the use of pyrosequencing of soil metagenome. For the study, the collection of soils from different regions of Russia (19 samples) and also from the Crimea (Ukraine, 1 sample) was created. The bacteria from phylas of *Proteobacteria* (up 59.3 %), *Actinobacteria* (up 55.4 %), *Acidobacteria* (up 26.5 %), *Verrucomicrobia* (up 13.6 %), *Bacteroidetes* (up 10.5 %), *Firmicutes* (up 8.2 %), *Gemmatimonadetes* (up 6.9 %), *Chloroflexi* (up 5.7 %) and archaea from *Crenarchaeota* phyla were dominating in microbial associations. The comparison of taxonomic structure of microbial associations indicates that physiochemical factors (acidity and moisture of soil) have a more influence on prokaryote biodiversity than other factors (for example, type of soil or sampling point). So the soils from south regions with lesser moisture contain more the actinobacteria, when the moister north soils contain mainly the proteobacteria. The soils with low pH are characterized by a raise of acidobacteria percent.