

**Н. Х. Сергалиев, Е. Е. Андронов,
А. Г. Пинаев, М. Г. Какишев,
А. Т. Жиенгалиев, М. А. Володин, А. Ж. Турбаев**

Западно-Казахстанский аграрно-технический университет
им. Жангир хана
г. Уральск, Казахстан

**КЛАСТЕРНО-ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВ
ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ
МЕТАГЕНОМИКИ***

Аннотация. Проведена апробация методики выделения ДНК почвенной микробиоты на примере каштановых почв (Kastanozems) Западно-Казахстанской области. Выполнен таксономический анализ библиотек почвенного микробиома, согласно которому наибольшую долю в микробных сообществах проанализированных почв составляют филумы Actinobacteria и Proteobacteria. Заметную долю в составе микробиомов исследованных образцов занимают археи.

Ключевые слова: микробиома, почвенные микроорганизмы, ПЦР, секвенирование, таксономия, тип почвы, ДНК, агроэкология, мониторинг, молекулярная биология, 16s рРНК, метагеном.



Түйіндеме. Мақалада Батыс Қазақстан облысының топырағының (Kastanozems) мысалында топырақ микробиотының ДН• белу әдістемесін тексеру жүргізілді. Топырақтық микробиом жиынтығының таксономикалық талдауы жүргізілді, оған сәйкес зерттелген топырақ үлгілерінің микробты бірлестіктерінде Actinobacteria және Proteobacteria филумдары көп үлеске

**Проводимые работы выполнялись в целях реализации научно-исследовательского проекта "Использование методов современной метагеномики в оценке агроэкологического состояния почв Западного Казахстана" в рамках бюджетной программы 055 "Научная и/или научно-техническая деятельность", номер государственной регистрации - 0112РК00513.*

ие. Зерттелген үлгілердің микробиомдарының құрамында айтарлықтай үлесті археилар иеленген.

Түйінді сөздер: микробиома, топырақ микроағзалары, ПЦР, секвенирлеу, таксономия, топырақ түрі, ДНҚ, агроэкология, мониторинг, молекулалық биология, 16s рРНК, метагеном.



Abstract. The article presents the results of research on the use of the soil microbiota condition as an indicator of the agro-ecological condition of the soil. We carried out a taxonomic analysis of the soil microbiome libraries, according to which the Actinobacteria and Proteobacteria phyla dominate the microbial communities of the analyzed soils. The Archaea form a large part of the microbiome of the studied samples.

Key words: Microbiome, soil microorganisms, PCR, sequencing, taxonomy, soil type, DNA, agroecology, monitoring, molecular biology, 16s rRNA, metagenome.

Введение. 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 трудно выявляемые факторы. Например, при почвоутомлении. В настоящей работе для характеристики почв выбран ее микробиом, главной составляющей которого является геномный пул микроорганизмов - часть почвы, наиболее чуткая к любым изменениям. На сегодняшний день исследования в области молекулярной экологии микроорганизмов называются метагеномными. Объектом изучения метагеномики является метагеном, т. е. генетический материал, полученный непосредственно из окружающей среды без предварительного культивирования микроорганизмов.

Основная идея, лежащая в основе исследований, - анализ структуры почвенного микробиома с использованием методов современной метагеномики 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 [1-3]. Предлагаемый проект является пионерским и не имеет аналогов в Ка-

захстане. Вместе с тем по крайней мере 2 европейских консорциума ведут исследовательские работы в данном направлении.

Методика. Отбор проб почв выполнялся согласно ГОСТ 17.4.4.02-84. Для проведения молекулярно-биологических исследований микробиома почвенных образцов применялась 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). 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. Выделение ДНК из почвы проводилось с помощью методики, основанной на экстракции с последующей очисткой методом электрофореза в агарозном геле и выделения из блоков агарозы, содержащей ДНК, с абсорбцией на тонкодисперсной окиси кремния [4]. Сравнительный кластерно-таксономический анализ библиотек, полученных из нативных почв, проводили на сайте RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) с использованием расстояния по Morisita-Horn, кластеризация по алгоритму UPGM.

Результаты и их обсуждение. В ходе работ была создана коллекция из 20 образцов почв, относящихся к основным типам почв Западно-Казахстанской области, представляющих собой целинные земли (таблица). Как видно, скорости электрофоретической миграции гуминовых компонентов гораздо выше, чем скорость миграции фракции ДНК (рис. 1). Именно на этой особен-

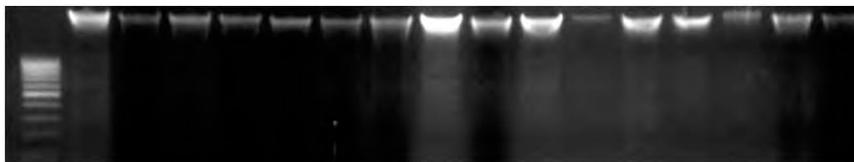


Рис. 1. Почвенная ДНК

Пробы почв Западно-Казахстанской области

Тип почвы	Место отбора	Образец	GPS координаты	Глубина отбора, см
Солонец каштановый	пос. Актау	01_SOLON_AKT_1	N50°56.869ү	0-10
		02_SOLON_AKT_1	E 051°07.938ү	10-20
Темно-каштановая неполно-развитая	пос. Актау	03_TKASHT_AKT_2	N51°00.150ү	0-10
		04_TKASHT_AKT_2	E 050°09.025ү	10-20
Темно-каштановая мало-развитая	пос. Актау	05_TKASHT_AKT_3	N51°00.532ү	0-10
		06_TKASHT_AKT_3	E 051°18.278ү	10-20
Солончак	пос. Новопавловка	07_SOLON_NVPL_4	N51°05.473ү	0-10
		08_SOLON_NVPL_4	E 051°42.515ү	10-20
Лугово-каштановые	пос. Новопавловка	09_LKASHT_NVPL_5	N51°08.774ү	0-10
		10_LKASHT_NVPL_5	E 051°39.234ү	10-20
Темно-каштановая сред-немошная	пос. Новопавловка	11_TKASHT_NVPL_6	N51°06.823ү	0-10
		12_TKASHT_NVPL_6	E 051°39.694ү	10-20
Светло-каштановая	пос. Талдыапан	13_SKASHT_TLD_7	N49°33.450ү	0-10
		14_SKASHT_TLD	E 050°16.249ү	10-20
Каштановая	пос. Кушум	15_KASHT_KUSH_8	N50°52.599ү	0-10
		16_KASHT_KUSH_8	E 051°06.489ү	10-20
Чернозём южный	пос. Щукино	17_CHRZ_SHUK	N51°40.301ү	0-10
		18_CHRZ_SHUK	E 050°48.889ү	10-20
Пойменная каштановая	ЗКО г. Уральск пойма р. Урал	19_POJM_URA	N51°07.731ү	0-10
		20_POJM_URA	E 051°21.848ү	10-20

Из данных образцов была получена тотальная ДНК.

Ауыл және орман шаруашылығы

150

ности базируется дальнейшая очистка препарата ДНК. Процесс отделения гуминовых компонентов ясно виден в геле во время электрофореза при обычном освещении. Затем вырезают блок агарозы, содержащий ДНК, и проводят окончательную очистку препарата методом сорбции ДНК на окиси кремния [5,6].

Определение концентрации ДНК показало, что метод позволяет выделять до 2-5 мкг ДНК из 1 г почвы, что свидетельствует о высоком выходе. Кроме того, выделенная ДНК отличается высокой чистотой (для почвенной ДНК), так как эффект ингибирования не наблюдается при концентрации ДНК в реакции ПЦР до 0,2 нг/мкл.

Проведено исследование почвенного микробиома высокопроизводительным секвенированием с использованием 20 мультиплексных fusion-праймеров и почвенной ДНК. Их концентрации были выровнены с использованием гель-денситометрии, затем амплификаты были объединены, переочищены путем выделения суммарной библиотеки из геля. После очистки суммарной библиотеки ее концентрация была нормирована на 10 млн. копий фрагмента гена 16S рРНК на мкл с использованием точного определения концентрации на флуориметре (краситель SYBR-gold, прибор QUBIT, Invitrogen). Секвенирование библиотеки проведено в точном соответствии с рекомендациями к прибору GS Junior (Roche). При анализе по доменальному распределению во всех образцах выявлены 2 основных домена – домен Bacteria и Archaea, причем с явным преобладанием первого домена. Путем проведения кластерно-филумного анализа выявлены 27 филумов, явно преобладающие филумы Actinobacteria 23-38 %, Proteobacteria 9-48 %, а также неатрибутируемые филы 13-32 %. При проведении кластерного анализа распределения по классам выявлены 63 класса, в том числе 15 неатрибутируемых. Распределение микробов по отрядам составило 110 отрядов, из них 28 отрядов неатрибутируемые. Доминирующим отрядом также является Actinomycetales из класса Actinobacteria 5-13 % и 13-32 % неатрибутируемых Bacteria по отрядному и вышестоящей классификации. Выявлено 215 семейств, из них преобладают неатри-

бируемые 47 семейств бактерий с частотой распределения 13-32 %, тогда как других семейств – менее 10 %.

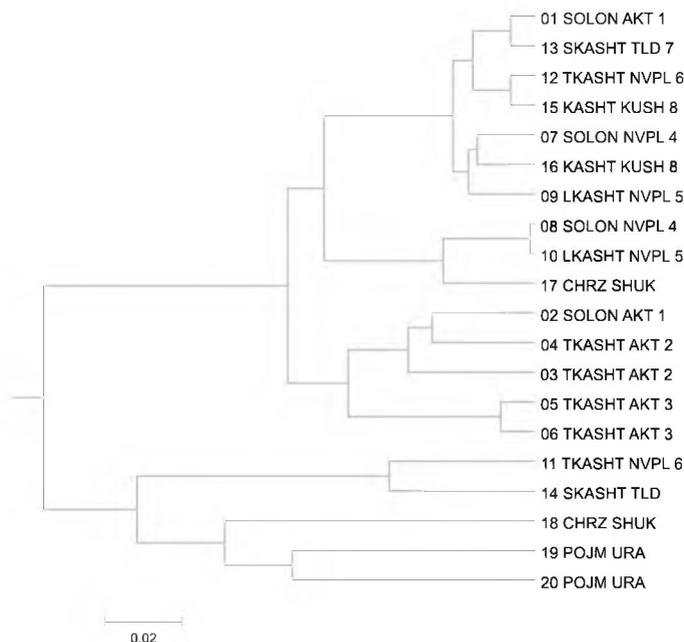


Рис. 2. Кластерный анализ микробиома нативных почв Западно-Казахстанской области

При кластеризации по родовому распределению выявлены 474 рода, из них 126 неатрибуируемые. Число распределения их по образцам почв – 15-32 %, других родов – не более 5 % в образце.

Кроме того, проведено построение кластерного дерева по семействам и родам. Деревья построены по результатам кластерного анализа – по родам, также с учетом неатрибуируемых таксонов и соответствующих родству по агрохимическим показателям (рис. 2).

Выводы. В ходе исследований установлено, что неатрибутируемых последовательностей в почве очень много: причем чем ниже ранг, тем их больше. Они могут иметь самое большое значение при попытках связать свойства почвы с ее характеристиками. Проведен кластерный анализ нативных почв от домена до рода. Отмечается явная тенденция увеличения неатрибутируемых бактерий в образцах почв при анализе распределения бактерий от филумов до рода. Возможно, данные бактерии играют важную роль в оценке микробиома и его связи с агрохимическим состоянием почвы.

Список литературы

1 *Brajesh K. Singh* Soil genomics [Text] / Colin D. Campbell, Soren J. Sorenson et al. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2009. – V. 7. – P. 756.

2 *Gerlach W.* WebCARMA: a web application for the functional and taxonomic classification of unassembled metagenomic reads [Text] / S. Junemann, F. Tille // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – V. 10. – P. 430.

3 *Warnecke F.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite [Text] / P. Luginbuhl, N. Ivanova // *Nature*. - 2007. - V.450. - P. 560-565.

4 *Сергалиев Н.Х., Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Какишев М.Г., Захарян Р.А.* Использование методов современной метагеномики в оценке микробиоты почв Западно-Казахстанской области // *Вестник КазНУ. Сер. биолог.* – 2013. – № 1 (57). – С. 133-138.

5 *Andronov E.E., Petrova S.N., Pinaev A.G., Pershina E. V., Rahimgalieva S.Zh., Ahmedenpv K. M., Gorobec A. V., Sergaliev N. H.* Research the structure of microbial community in soils of different degrees of salinity using T-RFLP and Real-Time PCR// *Eurasian soils*. – 2012. – № 2. – P. 173-183.

6 *Сергалиев Н.Х., Захарян Р.А., Какишев М.Г.* Применение молекулярно-биологических методов при исследовании почвенно-микробиологических процессов // *Наука и образование.* – 2013. – № 1 (30). – С. 27-29.