

ВЫЯВЛЕНИЕ РАЗЛИЧИЙ В МИКРОБИОМАХ ТИПИЧНОГО ЧЕРНОЗЕМА В РОССИИ (ПАШНЯ И ЦЕЛИНА)

Горбачева М.А.¹, Чуриков Н.А.² Email: Gorbacheva639@scientifictext.ru

¹Горбачева Мария Александровна – кандидат биологических наук, инженер-исследователь;

²Чуриков Николай Андреевич - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией, лаборатория эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов,

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта,

г. Москва,

Аннотация: традиционные методы в анализе микробного разнообразия почв дают грубые и неоднозначные результаты. Даже секвенирование по 16S рРНК имеет существенные ограничения по идентификации организмов на уровнях семейств и видов. С помощью глубокого секвенирования можно более детально охарактеризовать микробиомы в различных видах черноземов. В данной работе с помощью глубокого секвенирования и метагеномного анализа исследована таксономическая структура типичного чернозема южной части России под целиной и пашней.

Ключевые слова: целина, пашня, чернозем, микробиом, глубокое секвенирование, микроорганизмы, грибы.

IDENTIFICATION OF DIFFERENCES IN MICROBIOMES OF TYPICAL CHERNOZEM IN RUSSIA (ARABLE LAND AND VIRGIN LAND)

Gorbacheva M.A.¹, Tchurikov N.A.²

¹Gorbacheva Maria Alexandrovna – PhD, Engineer-Researcher;

²Tchurikov Nikolay Andreevich - Doctor of Biological Sciences, Professor,

LABORATORY MANAGER OF THE EPIGENETIC MECHANISMS OF REGULATION OF GENE EXPRESSION,

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY BY V.A. ENGELHARDT,

MOSCOW

Abstract: traditional methods of soil analysis give crude and ambiguous results in the analysis of microbial diversity. Even the sequencing of more than 16S rRNA has significant limitations in identifying organisms at the family and species level. With the help of deep sequencing, it is possible to characterize microbiomes in different types of chernozems in more detail. In this work, using deep sequencing and metagenomic analysis, the taxonomic structure of a typical chernozem of the southern part of Russia under virgin land and arable lands was studied.

Keywords: virgin soil, cropland, Kursk chernozem, microbiomes, deep sequencing, microorganisms, fungi.

УДК 579.8

За последние двадцать лет в мире микробиологии произошла революция, связанная с пониманием истинной степени биологического разнообразия. На сегодняшний день проводятся исследования в области молекулярной микробной экологии, которые в общем называют метагеномными исследованиями. Изучение метагенома стало возможным без культивирования микроорганизмов, так как генетический материал может быть извлечен непосредственно из почвы.

Известно, что сообщества микроорганизмов принимают участие в: деградации органического вещества [1], круговороте цикла азота и минеральном выветривании и, таким образом, обеспечивают растения необходимыми питательными веществами [2-3]. Большинство этих знаний были получены благодаря методам культивирования. Показано, что функциональное и таксономическое разнообразие почвенных микробных сообществ сильно подвержено таким факторам окружающей среды, как почвенные характеристики (рН, доступность питательных веществ), климатические изменения и биотические взаимодействия [4-7], указывающие на то, что микробные сообщества почв являются хорошими индикаторами функционирования экосистем. С помощью современных методов секвенирования изучают микробные сообщества в различных объектах окружающей среды, таких как луговые почвы [8-9], пахотные почвы [10], лесные почвы, морские осадочные отложения. В дополнение, были проведены исследования микробного разнообразия сообществ, а также активности микроорганизмов в верхних слоях почвы елового леса. Эти подходы показали, что между численностью и активностью микроорганизмов в почве существует не тривиальная, на первый взгляд, связь, так как организмы с малой численностью обладали высокой активностью в почве. Эти исследования обеспечили всесторонний взгляд на микробные сообщества на основании секвенирования генов 16S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS). Помимо этого, определение разнообразия и распределение микробных сообществ в окружающей среде позволило исследовать функциональные

возможности этих комплексных сообществ и открывать их новые функции. Такой подход ранее был использован, чтобы провести оценку набора микробных генов в пищеварительном тракте человека, в изучении ассоциаций муравьев-листорезов и исследованиях метабеномов сухопутных и морских объектов окружающей среды. Более ранние работы по применению shotgun секвенирования также были применены для луговых [4], сельскохозяйственных почв, а также почв вечной мерзлоты, чтобы охарактеризовать влияние удобрений, сезонных изменений, вертикального распределения, и изучения «ответа» таяния льдов вечной мерзлоты на почвенные микробные сообщества. Эти исследования, а точнее их последующая аналитическая часть, включают в себя биоинформатические инструменты, управляющие массивом полученных данных, с помощью их сравнения со специализированными базами: CAZYmes, MG-RAST, RDP.

Основная задача исследования - определение различий в таксономической структуре почвенных микробиомов в двух типах черноземов России (пашня и целина), отобранных в верхнем слое почвенного профиля (0-10 см). Возможно естественное снижение доступных питательных веществ между пахотными и целинными горизонтами влияет на распределение микробных сообществ. Чтобы получить наиболее полное представление о таксономическом составе микробных сообществ чернозема, был применен метод глубокого секвенирования на платформе Illumina.

Образцы почв (пашня и целина) отбирали в стерильные пакеты на сухом льду в марте 2013 года (целина - биосферный заповедник имени Алехина, а пашня - поле научно-исследовательского института агропромышленного производства) (Курск).

До выделения ДНК образцы хранили при -70°C . ДНК выделяли с использованием набора Power Soil (MO BIO, США). Из каждого образца использовали 0,25 г почвы. Конечные препараты ДНК были растворены в 50-100 мл стерилизованной деионизированной воды и хранились при -70°C . Выход ДНК составлял 7-17 мкг на образец, что было проверено с помощью Nanodrop 2000.

ДНК каждого образца обрабатывали ультразвуком для получения фрагментов размером 300-500 нк. Для приготовления библиотеки использовали около 1 мкг такой ДНК. Библиотеки ДНК были подготовлены в соответствии с инструкциями Illumina. Глубокое секвенирование (две реплики для каждого образца) выполнялось с использованием анализатора Illumina Genome Analyzer Ix.

На основании проведенных экспериментов было показано, что целина и пашня в Курской области обладают определенными сходствами по составу микробиомов за счет общего географического расположения и климатических условий. В обоих типах почв преобладали бактерии (98-99%). Незначительные различия наблюдались на уровне класса, вида среди десяти самых распространенных таксонов. Показано, что преобладали в целине и пашне два филума - *Proteobacteria* и *Actinobacteria* составляющие 60% и 20% соответственно.

Интересным результатом этого исследования также является выявление основных различий между целиной и пашней на всех уровнях таксономической иерархии среди менее распространенных таксонов. На первый взгляд схожие типы почв должны обладать сходствами в составе их микробиомов, но, как выяснилось, это не относится к минорным таксонам. Показано, что целинная почва обладает более высоким разнообразием среди гораздо менее выраженных микробных таксонов и в 2 раза больше обогащена данными таксонами. Вероятно, что минорные таксоны почвы представляют собой функционально более важное микробное сообщество. Известно, что почва является основным источником микроорганизмов, которые взаимодействуют с растениями и представляют собой одну из самых биологически разнообразных экосистем на Земле. Заключение о важной роли второстепенных микробных компонентов подтверждается недавними независимыми наблюдениями о том, что даже незначительные изменения в изобилии некоторых бактерий могут оказать существенное влияние на защиту растений и физиологию с минимальным воздействием на общую структуру микробиома.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (тема № 0103-2014-0005) и при поддержке РФФИ (проект № 16-34-00-285 мол_а).

Список литературы / References

1. *Albertsen M., Hansen L.B., Saunders A.M., Nielsen P.H., Lehmann N.K.*, 2011. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. ISMEJ.
2. *Amann R.I., Ludwig W. & Schleifer K.H.*, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59: 143–169.
3. *Baldrian P., Kolarik M., Stursova M., Kopecky J., Valaskova V. et al.*, 2011. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. ISME J.
4. *Bartram A.K., Lynch M.D., Stearns J.C., Moreno-Hagelsieb G., Neufeld J.D.*, 2011. Generation of multi-million 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. Appl Environ Microbiol 77: 3846–3852.

5. Bergmann G.T., Bates S.T., Eilers K.G., Lauber C.L., Caporaso J.G. *et al.*, 2011. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol and Biochem* 43: 1450–1455.
6. Biddle J.F., Fitz-Gibbon S., Schuster S.C., Brenchley J.E., House C.H., 2008. Metagenomic signatures of the Peru Margin seafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proc Natl Acad of Sci USA* 105: 10583–10588.
7. Buee M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R.H. *et al.*, 2009. 454-pyrosequencing analyses of forest soil reveal an unexpectedly high fungal diversity.
8. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V. *et al.*, 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl Ac Res* 37: D233–238.
9. Cole J.R., Chai B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang Q. *et al.*, 2003. Ribosomal Database Project. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *NuclAc Res* 31: 442–443.
10. Courty P.E., Buee M., Diedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F. *et al.*, 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biol and Biochem* 42: 679–698.