

УДК 579.64:631.46(574.1)

Нагиева А.Г., Ph.D

НАО «Западно – Казахстанский агротехнический университет имени Жангир хана»,
г. Уральск, Республика Казахстан

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОМОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВ ЗАПАДНО - КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Аннотация

В статье приведены результаты исследований почвенного микробиома темно-каштановой почвы Западно-Казахстанской области. Значительное число метагеномных исследований почвы касается проблем устойчивости экосистем и оценки последствий антропогенного воздействия на почву. Методы высокопроизводительного секвенирования остаются на данный момент наиболее перспективными инструментами для расширения знаний о филогенетическом, и, отчасти, физиологическом разнообразии почвенных микроорганизмов. Все разработанные в ходе выполнения работы методы, позволили выделить чистую ДНК, свободную от ингибирующих примесей. Полученные в настоящем эксперименте образцы ДНК, были использованы при испытании серии мультиплексных праймеров, разработанных в ходе работы. В результате проведения амплификации проанализированных образцов различных типов почв было показано, что препараты ДНК пригодны для получения ПЦР-фрагментов полного гена 16S рРНК. Анализ структуры микробного сообщества проводили по трем таксономическим категориям – домены, филы и семейства. Представителями домена выступили - археи и бактерии. При анализе таксономической структуры почвенных микробиомов на уровне домена было обнаружено, что наибольшее количество в сообществе составляют бактерии. Археи в исследованных образцах обнаружены с низкой численностью, что может быть связано с наличием эффекта избирательной амплификации в мультиматричной ПЦР, связанного с различным родством выбранных нами праймеров к последовательностям бактерий и архей.

Ключевые слова: почвенный микробиом, микробное сообщество, секвенирование, таксономия, почва.

При изучении микроорганизмов, выделенных из любой почвы, поражает их разнообразие, но главное то, что они обладают часто противоположными и несовместимыми для одной среды обитания свойствами. Большая часть исследований, посвящённых почвенным микробным сообществам, так или иначе, касается гумуссодержащих почвенных горизонтов, но только единичные работы рассматривают гумусоаккумулятивный почвенный горизонт как структурно и функционально изолированную и постоянно эволюционирующую почвенную структуру. Многие исследования показывают с использованием различных методов в почве с глубиной снижение микробной биомассы, метаболического и генетического разнообразия, обусловленное, прежде всего, низкой доступностью органического вещества [1-4]. Тем не менее, в определенных количествах микроорганизмы присутствуют и в минеральных горизонтах почвы, и в нижележащих геологических отложениях [5], согласно некоторым оценкам, около 35-50 % почвенной микробной биомассы приходится именно на слои почвы, залегающие глубже гумусовых горизонтов [6,7].

В ходе исследований получены данные микробиома исследуемых типов почв Западно-Казахстанской области.

Целью работы было изучение таксономического состава почвенного микробиома различных почв Западно-Казахстанской области.

Исследуемые почвенные разрезы заложены на темно-каштановой, лугово-каштановой и солонцовой почвах различных ценозов. Почвенные образцы отобрали по всему профилю. Для выделения ДНК к навеске 0,2 г замороженной почвы, добавили равное по объему количество шариков, 350 мкл раствора А, 350 мкл раствора Б и 400 мкл смеси фенол-хлороформ и разрушили образец при максимальной мощности в течении 1 мин на приборе «FastPrep». Подготовку проб и секвенирование провели на приборе GS Junior, Roche. Обработку полученных данных провели с помощью программы «QIIME» [8]. В результате всех проведенных работ секвенировано 82178 последовательностей. С помощью оценки таксономического состава, индексов Шеннона, ChaoI для оценки биоразнообразия и проведения сравнительного анализа сообществ рассчитаны α - и β -разнообразия.

Основным этапом при использовании молекулярно-генетических методов является выделение ДНК, так как от качества и количества препаратов ДНК зависит результат всех исследований. Все разработанные в ходе выполнения работы методы, позволили выделить чистую ДНК, свободную от ингибирующих примесей. На рисунке 1 представлена картина электрофоретического разделения сырого экстракта почвенной ДНК, полученного на первой стадии выделения.

В данном случае фрагментация ДНК является следствием интенсивного встряхивания с матриком (FastPrep 24, 1 мин, макс. интенсивность). Очевидно, что с использованием разработанных методов удалось выделить препарат ДНК, которых характеризуется почти полным отсутствием деградации.

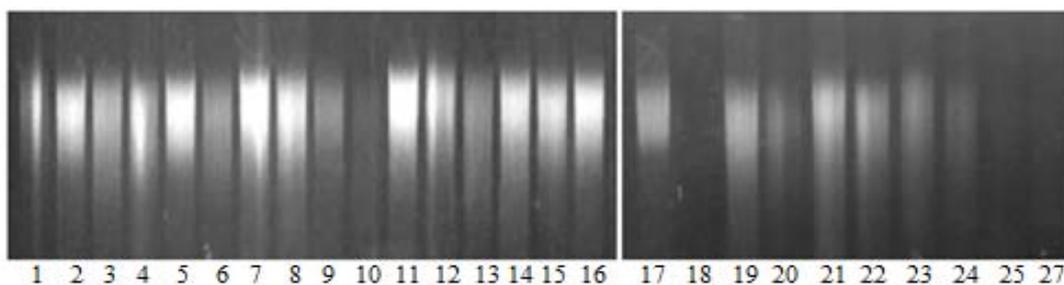


Рисунок 1 - Обнаружение почвенной ДНК в исследуемых образцах (1-25, 27 генетические горизонты)

Определение концентрации ДНК показало, что использование разработанных методов 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.

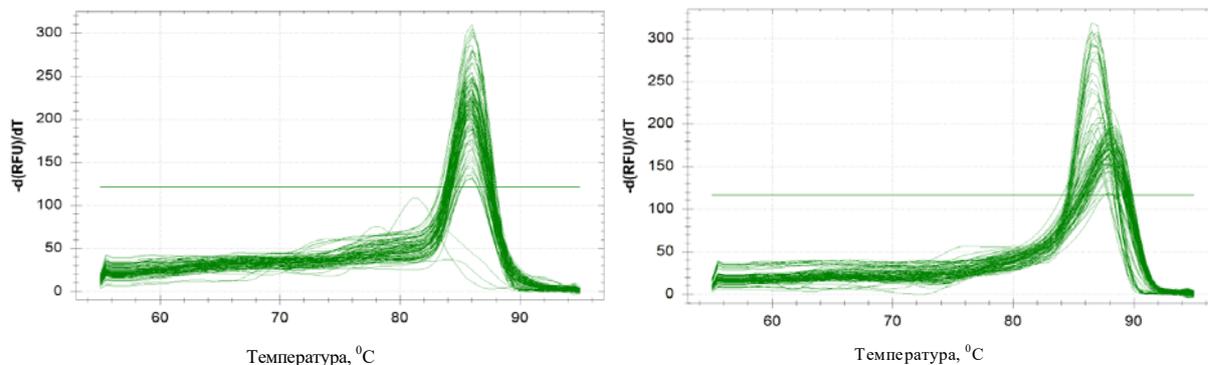
Полученные в настоящем эксперименте образцы ДНК, были использованы при испытании серии мультиплексных праймеров, разработанных в ходе работы. В результате проведения амплификации проанализированных образцов различных типов почв было показано, что препараты ДНК пригодны для получения ПЦР-фрагментов полного гена 16S рРНК. Для секвенирования ДНК из почв были подобраны праймеры для библиотек Lib-L (таблица 1).

Для всех почвенных образцов применяли одинаковый праймер, который в ходе исследования изменял последовательность в каждом образце. Данные, полученные в результате секвенирования, представляют собой сотни тысяч нуклеотидных последовательностей. Такой анализ с большим объемом генетической информации очень трудно провести вручную и невозможно провести без применения специализированных компьютерных программ. Выбранные последовательности были разделены в соответствии с баркодами с соответствующими алгоритмами. Из полученных первичных данных исключили некачественно прочитанные последовательности и почищены от химерных последовательностей, которые образуются в процессе амплификации рекомбинанты между двумя или более последовательностями.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для создания библиотек гена 16S рРНК

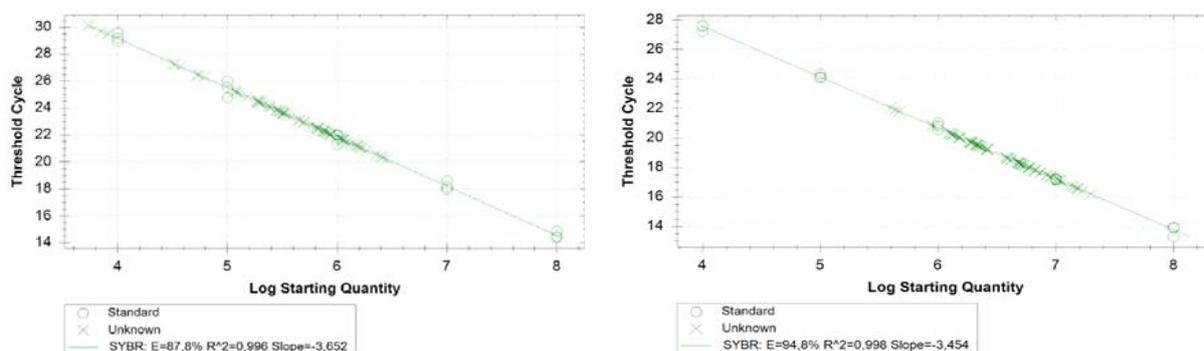
Образцы	№	Баркод	Прямой праймер	Обратный праймер
Темно-каштановая, целина	1	ACGAGTGCCT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	2	ACGCTCGACA	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	3	AGACGCACTC	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	4	AGCACTGTAG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	5	ATCAGACACG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Темно-каштановая, пастбище	6	ATATCGCGAG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	7	CGTGTCTCTA	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	8	CTCGCGTGTC	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	9	TCTCTATGCG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	10	TGATACGTCT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Темно-каштановая, пашня	11	CATAGTAGTG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	12	CGAGAGATAC	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	13	ATACGACGTA	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Солонец, целина	14	TCACGТАCTA	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	15	CGTCTAGTAC	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	16	TCTACGTAGC	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Солонец, пастбище	17	TGТАCTACTC	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	18	ACGACTACAG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	19	CGTAGACTAG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	20	TACGAGTATG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Солонец, пашня	21	TACTCTCGTG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	22	TAGAGACGAG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	23	TCGTCTGCTCG	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Лугово-каштановая, целина	24	ACATACGCGT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
	25	ACGCGAGTAT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT
Лугово-каштановая, пастбище	27	ACTACTATGT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACVSGGGTATCTAAT

Методом ПЦР реального времени оценивали содержание общего микробного и архейного пула естественных и антропогенно-загрязненных почв с применением праймеров к гену универсальной рРНК. Кроме того, были проанализированы постамплификационные кривые плавления продуктов. Количество бактерий и архей в образцах определяли путем построения калибровочных кривых для серий десятикратных разведений ДНК (рисунки 2, 3).



А. архей Б. бактерии

Рисунок 2 - Кривые плавления ПЦР-продуктов, полученные при использовании праймеров к гену универсальной 16S рРНК



А. архей Б. бактерии

Рисунок 3 - Калибровочная кривая серий десятикратных разведений контрольной ДНК

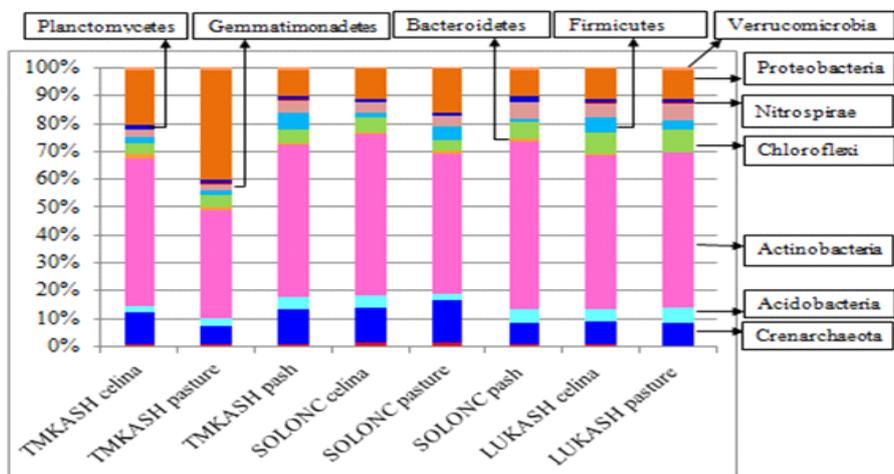
При изучении в любой почве наблюдается большое разнообразие микроорганизмов, но главное то, что они обладают часто противоположными и несовместимыми для одной среды обитания свойствами. Большую часть ненарушенных почв составляют представители фила *Actinobacteria* (до 55%). Анализ структуры микробного сообщества проводили по трем таксономическим категориям – домены, фила и семейства. Представителями домена выступили - археи и бактерии. При анализе таксономической структуры почвенных микробиомов на уровне домена было обнаружено, что наибольшее количество в сообществе составляют бактерии. Археи в исследованных образцах обнаружены с низкой численностью, что может быть связано с наличием эффекта избирательной амплификации в мультиматричной ПЦР, связанного с различным сродством выбранных нами праймеров к последовательностям бактерий и архей (с выбором амплификацией бактериальных последовательностей) (рисунок 3).

Бактериальные сообщества горизонтов исследуемых типов почв сформированы преимущественно филумами *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. При сравнении таксономической структуры образцов доминировали фила – *Actinobacteria* (38,6-60,1%),

Proteobacteria (8,5-39,2%), *Chloroflexi* (4,0-8,0%), *Acidobacteria* (2,1-5,3%), *Gemmatimonadetes* (2,6-6,0%), *Firmicutes* (1,1-5,4%) (рисунок 3А).

Самыми многочисленными представлены филы *Actinobacteria* в ТМКASH pash и SOLONC pash (54,0% и 60,1% соответственно). Такое распространение можно объяснить повышенной устойчивостью характерная актиномицетам к низкому содержанию влаги с длительным засушливым периодом.

А



Б

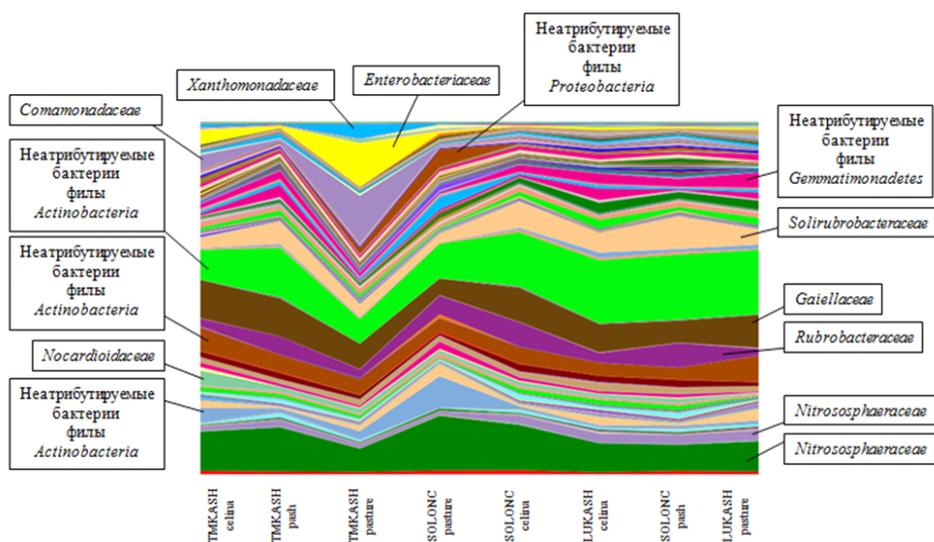


Рисунок 3 - Таксономическая структура почвенных микробиомов в исследуемых разрезах на уровне фил (А) и семейств (Б)

Следующими доминантами, играющими важную роль в циклах биогенных элементов в природе выступили бактерии *Proteobacteria* в образцах темно-каштановых почв от 9,3 до 39,2%, которые превышали в два раза солонцовые и лугово-каштановые почвы. Филы *Acidobacteria* выступили в разных долях в одном типе почв, но в различном по виду использования, так они преобладали в пахотных ТМКASH pash (4,4%), но вдвое меньше в ТМКASH celina и ТМКASH pasture (2,5% в каждом), на засоленных почвах с наименьшей численностью в 2,1% отмечены SOLONC pasture, когда в SOLONC celina и SOLONC pash их количество увеличилось в два раза. В LUKASH почвах на целине и пастбище составили 4,5и 5,3% соответственно. Бактерии из фил *Chloroflexi* преобладали в LUKASH celina и pasture почвах с численностью 8,0 и 7,6% соответственно, на участках других типов почв их содержание колеблется в пределах 4,0-5,7%. Доминирование фил *Firmicutes* отмечено в

ТМКАШ pash (5,6%), SOLONC pasture (4,7%) и LUKASH celina и pasture (5,4% и 3,6). Фирмикуты относятся к общему компоненту почвенных микроорганизмов и присутствуют во всех типах почвах, устойчивы к высушиванию, поэтому в засушливых климатических условиях могут поддерживать численность.

Большая доля фила *Gemmatimonadetes* отмечена на участке SOLONC pash (6,0%) и LUKASH pasture (5,6%). Содержание в почвенных образцах других представителей фил составляет незначительную долю в пределах 0,1 до 1,7% от общей суммы. Археи *Crenarchaeota* семейства *Nitrososphaeraceae* преобладали на целинных и пастбищных участках солонцов от 12,8% до 15,5%, на пахотных участках их численность сокращалась почти вдвое. В темно-каштановых почвах с содержанием 12,5% лидировали целинные и 11,1% пахотные участки, на пастбище они достигали до 6,6%. В лугово-каштановых почвах нарушенные и ненарушенные участки не отличались численностью, составили в пределах 8%.

Сложная структура микронных сообществ выявлена на уровне семейств, где их доля в почвенных образцах составила 0,1-15,5% (рисунок 3 Б). В образце ТМКАШ celina самыми многочисленными были последовательности семейства *Gaiellaceae* (10,9%), *Nocardiodaceae* (4,2%), в образцах SOLONC celina и LUKASH celina на 2% и более ниже. В образцах SOLONC celina доминировали представители семейств *Solirubrobacteraceae* (до 7,6%), *Rubrobacteraceae* (до 6,8%), *Geodermatophilaceae* (1,5%) [9]. Представители семейства *Patulibacteraceae* (1,6%), *Streptomycetaceae* (2,5%). Фил *Chloroflexi*, представленный только одним семейством *Kouleothrixaceae* не был обнаружен в ТМКАШ celina, в других образцах в незначительной доле (до 0,5%). Бактерии домена *Proteobacteria* 19 семейств, доминирующим выступил *Comamonadaceae* (4,4%), *Enterobacteriaceae* (4,1%), *Xanthomonadaceae* (1%) в ТМКАШ pash. Во всех вариантах присутствуют неидентифицируемые бактерии в небольших количествах. Возможно, такое содержание и уменьшение биоразнообразия по профилю обусловлено не только увеличением глубины и снижением содержания органического вещества, но и качественным изменением всей совокупности почвенных свойств, при переходе верхних к более глубоким слоям почвенного профиля. Возможно, что доминирующие таксоны, где численность и состав микробных сообществ отражаются в определенных типах почв являются специфичными [10].

Проведенные исследования свидетельствуют, что таксономическая структура почвенных микробиомов отобранных образцов, определяется не столько физико-химическими, сколько оказываемой на них антропогенной нагрузкой (распашкой и использованием в качестве пастбищ). Антропогенное воздействие на почвы приводит к снижению биоразнообразия как на уровне фила, так и на более низких таксономических уровнях. В ненарушенных почвах сообщество является более сбалансированным, с преобладанием как актинобактерий, свойственных почвам засушливых местообитаний, так и протеобактерий. В антропогенно-нарушенных почвах (пастбище и пашня) равновесие смещается в сторону актинобактерий, которые становятся абсолютными доминантами. Ксерофильная группировка в ненарушенных почвах также разнообразна и включает не только актинобактерии, но и некультивируемых бактерий из сравнительно описанной группы *Gemmatimonadetes*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Аханов Ж.У. Аналитическая записка о тенденции развития почвенной науки // Почвоведение и агрохимия. –2008. - №1. - С. 6-13.
- 2 Зайцева О.В. Динамика целлюлозоразлагающей, инвертазной и полифенолоксидазной активности почвенной микрофлоры Самарской области // Вестник СамГУ. - 2006. - № 9. - С. 138-144.
- 3 Torsvik V., Evreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems // Current Opinion in Microbiology Journal. - 2002. - Vol. 5. - I. 3. - P. 240-245.
- 4 Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. - 1995. – Vol. 59. - №3. – P. 143-169.

5 Ward J.E.M., Wellington E.M.H. Bacterial community analysis in polluted soils using molecular and metabolic techniques. Abstr. // ASM Conference of Microb. Biodiversity. - Chicago, Illions, 1999. - P.42.

6 Полянская Л.М., Гейдебрект В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г. Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // Почвоведение. – 1995. - №3. – С.322-328.

7 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии // В кн.: Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - 479 с.

8 Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. – СПб.: ВНИИСХМ РАСХН, 2011. – 23 с.

9 Sergaliev N.Kh., Nagieva A.G. Comparative analysis of microbial communities of different soils in West-Kazakhstan. // European Science and Technology: materials of the XV international research and practice conference. – Munich: Vela Verlag Waldkraiburg, 2016. – P. 95-102.

10 Нагиева А.Г., Сергалиев Н.Х., Андронов Е.Е. Изучение микроорганизмов почв Западного Казахстана методом метагеномного секвенирования // Исследования, результаты. КазНАУ. – 2017. - № 3 (75). - С. 309-315.

ТҮЙІН

Секвенерлеу барысында алынған нәтижелер жүз мың нуклеотидті тізбектерден құрылды. Топырақ бейіні бойына биоалуантүрліліктің болуы және азауы тереңдікке және органикалық зат құрмының төмендеуімен ғана емес, сонымен қатар топырақ қасиетінің барлық жиынтығының сапалық өзгерісі, топырақ бейінің беткі қабатынан төменгі қабатына ауысуна да байланысты. Микробты қауымдастығының саны және құрамындағы доминантты таксондар белгілі топырақ түрінде көрініс тауып ерекшеленуі мүмкін. Зерттеулер көрсеткендей, алынған үлгілердің топырақ микробиомаларының таксономиялық құрылымы тек қана физика-химиялық заттармен ғана емес, оларға антропогендік жүктеменің (жер жырту және жайылым ретінде пайдалану) әсерімен де анықталады. Топыраққа антропогендік әсер ету ету биоәртүрліліктің фила деңгейінде де, төмен таксономиялық деңгейде төмендеуіне әкеледі. Бұзылмаған топырақтарда қауымдастық теңдестірілген, протеобактериялармен қатар құрғақшылықта мекендеуге бейімділігіне тән актинобактериялар басым болады. Антропогендік бұзылған топырақтарда (жайылымдық және егістік жерлер) тепе-теңдік абсолютті доминантқа айналатын актинобактерияларға ауысады.

RESUME

Sequencing data are hundreds of thousands of nucleotide sequences. The content and reduction of biodiversity along the profile is due not only to an increase in depth and a decrease in the content of organic matter, but also to a qualitative change in the entire set of soil properties when the upper ones go to deeper layers of the soil profile. It is possible that the diminutive taxa, where the abundance and composition of microbial communities are reflected in certain soil types, are specific. Studies have shown that the taxonomic structure of soil microbiomes of selected samples is determined not so much by physicochemicals as by the anthropogenic load exerted on them (plowing and use as pastures). Anthropogenic impact on soils leads to a decrease in biodiversity both at the phyla level and at lower taxonomic levels. In undisturbed soils, the community is more balanced, with a predominance of both actinobacteria inherent in soils of arid habitats and proteobacteria. In man-made disturbed soils (pasture and arable land), the equilibrium shifts toward actinobacteria, which become absolute dominants.