



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ РОДОВОГО СОСТАВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФЛОРЫ ГРУНТА, ВОДЫ И ОСАДКОВ НОВОГО И СТАРОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА ОАО «СОДА» (г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Россия, 614081 Пермь, ул. Голева, 13. e-mail - Anechka_Shilova@mail.ru

Резюме

Проведен сравнительный метагеномный анализ микробного сообщества щелочных биотопов антропогенного происхождения. Объектами исследования являются отложения шламохранилища ОАО "Сода" (рН от 11 до 12,6) и грунты осушенного содового озера (рН 7,5-8,6), на котором началось частичное восстановление растительного покрова. Во всех изученных образцах антропогенного происхождения преобладали представители *Gammaproteobacteria* и *Firmicutes*. В то же время были выявлены большие отличия в филогенетическом составе домена Бактерии. На территории шламохранилища преобладали представители родов *Staphylococcus* и *Acinetobacter*, а в грунте старого осушенного содового озера на глубине 10 см доминировал род *Cellulomonas* (*Cellulomonas uda*).

Ключевые слова: алкалофильные бактерии, метагеном, микробиоценоз, содовое озеро, шламохранилище

Цитирование – Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Метагеномный анализ родового состава бактериальной флоры грунта, воды и осадков нового и старого шламохранилища ОАО «Сода» (г. Березники, Пермский край). *Биомика*. 2018. 10(1). С. 24-27. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-6

METAGENOMIC ANALYSIS OF THE GENERIC COMPOSITION OF THE BACTERIAL FLORA OF SOIL, WATER AND SEDIMENTS OF THE SLUDGE STORAGE FACILITY OF «SODA JSC» (BEREZNIKI CITY, PERM REGION)

Shilova A.V., Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm Federal Research Center UB RAS
Goleva st., Perm, 614081, e-mail - Anechka_Shilova@mail.ru

Resume

Comparative metagenomic analysis of microbial community of anthropogenic alkaline biotopes was provided. The objects of investigation are sediments the sludge storage of «Soda JSC» (pH 11-12.6), and soils of dried soda lake (pH 7.5-8.6), at which a partial restoration of the vegetation cover began. *Gammaproteobacteria* and *Firmicutes* prevailed in the studied samples of anthropogenic origin. There were revealed great differences in the phylogenetic composition of the *Bacteria*. Thus, *Staphylococcus* and *Acinetobacter* dominated on the territory of the sludge storage but *Cellulomonas* (*Cellulomonas uda*) dominated in the soil of the old drained soda lake at a depth of 10 cm.

Keywords: alkalophilic bacteria, metagenome, microbiocenosis, soda lake, slurry storage

Citation - Shilova A.V., Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G. Metagenomic analysis of the generic composition of the bacterial flora of soil, water and sediments of the sludge storage facility of «Soda JSC» (Berezniki city, Perm Region). *Biomics*. 2018. 10(1). P. 24-27. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-6 [In Russian]

Введение

Микробные сообщества содовых озер являются объектом интенсивных исследований, которые не теряют актуальности в течение последних десятилетий. В изучении разнообразия микробных сообществ активно применяются молекулярные методы. Содовые озера являются уникальными водными экосистемами, которые характеризуются высокой концентрацией солей и щелочными значениями pH. Исследование микробиоценоза представляет значительный интерес для понимания функционирования содовых озер как экосистем отдельного типа [Grant, 2006]. Однако разнообразие микробных сообществ щелочных биотопов антропогенного происхождения изучено мало, хотя в данном случае интерес представляет микробиоценоз в плане вторичной адаптации к защелачиванию и высокой концентрации солей.

Целью данного исследования является изучение микробиоценоза шламохранилища содового завода ОАО «Сода» г. Березники (Пермский край), а также осушенных территорий старого содового озера, на которых началось восстановление растительного покрова.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования было содовое озеро антропогенного происхождения, расположенное в черте г. Березники Пермского края (59° 24' 32" (59° 24' 54) северной широты 59.4091 в десятичных градусах, 56° 49' 13" (56° 49' 22) восточной долготы 56.8204 в десятичных градусах). Общая площадь составляет 244 км², общий объем шлама превышает 10 млн. м³ [Блинов и др. / Blinov et al., 2003], pH водной среды шламохранилища составляет 11-12.6, а pH отложений и почвоподобных образований – 7.5-11. Пробы грунта старого осушенного содового озера были отобраны в точке (59° 25' 654") северной широты (56° 43' 328") восточной долготы, pH грунта 8-8.5. Отбор проб воды и грунта проводили в сентябре 2017 г., пробы до выделения ДНК хранили при температуре 4°C непродолжительное время. Препараты хромосомной ДНК бактерий получали фенольным методом, модифицированным для выделения ДНК из актиномицет [Клонирование... / Glover, 1988].

С целью скрининга бактериальной микрофлоры проведен метагеномный анализ исследуемых образцов по генам 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina). Приготовление библиотеки для секвенирования проводили в соответствии с инструкциями и протоколами для секвенаторов MiSeq (Illumina 50 Rxn / Набор КАРА). Для получения необходимых ПЦР фрагментов использовали 2 раунда ПЦР. Использовали

нуклеотидные последовательности основных праймеров для региона 16S rRNA: V1F GAGTTTGATCMTGGCTCAG и V3R WTTACCGCGGCTGCTGG. Праймеры были синтезированы в ООО "Евроген" (Россия). ПЦР проводили набором Tersus PCR kit (ООО "Евроген", Россия). Первый раунд ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл 10x буфера; 2,5 мкл dNTP; 1 единицу активности Tersus-полимеразы; 1 мкл хромосомной ДНК, по 20 пмоль праймеров, и H₂O до 25 мкл. Реакцию проводили в амплификаторе «Т-100» фирмы «Bio-Rad». Режим амплификации: 95°C – 5' ([95°C – 30"; 57°C – 30"; 72°C – 30"] 25 циклов) 72°C – 5'; 10°C. После амплификации наличие ПЦР продуктов проверяли в 1,5% агарозном геле.

Далее проводили второй раунд ПЦР, в котором к полученным ПЦР-фрагментам добавляли MIDы. Второй раунд ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл 10x буфера; 2,5 мкл dNTP; 1 единицу активности Tersus-полимеразы; 5 мкл ПЦР-микса после первого раунда амплификации, по 20 пмоль праймеров, и H₂O до 50 мкл. Реакцию проводили в амплификаторе «Т-100» фирмы «Bio-Rad». Режим амплификации: 95°C – 2' ([95°C – 30"; 57°C – 30"; 72°C – 30"] 10 циклов) 72°C – 5'; 10°C. Длина ПЦР продукта (после отжига адаптора и довешенного MIDa) равнялась 534 пн. После второго раунда амплификации наличие ПЦР продуктов также проверяли в 1,5% агарозном геле. После визуализации фрагментов проводили двойную очистку каждого ампликона при помощи частиц AMPure XP по протоколу, рекомендуемому фирмой Roche. Двойная очистка позволяет очистить реакционную смесь от фрагментов короче 300 п.о. (димеры праймеров, неспецифические ПЦР-продукты). Далее оценивали концентрацию каждого ампликона, используя Quant-it Picogreen dsDNA Assay Kit, и смешивали ампликоны в эквимольном количестве до конечной концентрации каждого ампликона в пуле 5 нг. Качество библиотеки проверяли на биоанализере Agilent 2100.

Дальнейшие секвенирования полученной библиотеки проводили по протоколу для секвенаторов MiSeq. Из полученных данных на MiSeq проводили фильтрацию химерных ридов при помощи алгоритма Uchime* (часть программы Userach v7.0). Анализ фильтрованных данных секвенирования проводили по базе данных Ribosomal Database Project (RDP) <http://rdp.cme.msu.edu/>.

Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный метагеномный анализ образцов, отобранных в береговой зоне действующего шламохранилища ОАО "Сода" и на

территории старого содового озера, которое в настоящее время осушено и проходит стадию восстановления почвенного и растительного покрова. Выявлено, что в составе микрофлоры образцов с территории шламохранилища (табл. 1) преобладают представители родов *Staphylococcus* и *Acinetobacter*. Установлено, что доминирующими являются виды *Staphylococcus sciuri* и *Acinetobacter baumannii*, ДНК которых в разных образцах составляет в совокупности от 45 до 96% выделяемого метагенома. Причем количество представителей *Staphylococcus* во всех образцах было выше, чем *Acinetobacter* на 30,4-54,6%.

Таблица 1.

Доминирующие представители микрофлоры образцов береговых отложений шламохранилища
The dominant representatives of the microflora in samples of coastal sediments of sludge

Род / Genus	Количество ридов Quantity of reads	Процентная доля %
<i>Staphylococcus</i>	14629	38.30
<i>Acinetobacter</i>	10976	28.74
<i>Blautia</i>	2519	6.59
Unclassified at Genus level	1848	4.84
<i>Bacteroides</i>	857	2.24
<i>Alkaliphilus</i>	850	2.23
<i>Parabacteroides</i>	607	1.59
<i>Flavobacterium</i>	488	1.28

В поверхностной зоне грунта старого содового озера также доминировали данные виды с небольшим преобладанием *Acinetobacter baumannii*. Большие отличия по видовой принадлежности последовательностей генов 16S рРНК метагенома наблюдались в образцах грунта старого содового озера, отобранных на глубине 10 см (табл. 2).

Установлено, что в этих образцах преобладают представители класса *Actinobacteria*, в частности рода *Cellulomonas* (*Cellulomonas uda*), содержание которых составляло 25,6%. В целом данные образцы отличались большим видовым разнообразием (обнаружены представители более 60

родов бактерий). Также значительную долю составляли культуры *Lactococcus* (*Lactococcus fujiensis*) и *Ralstonia* (*Ralstonia pickettii*).

Таблица 2.

Доминирующие представители микрофлоры образцов грунта старого содового озера с глубины 10 см
Dominant representatives of microflora soil samples of the old soda lake from a depth of 10 cm

Род / Genus	Количество ридов Quantity of reads	Процентная доля %
<i>Cellulomonas</i>	18221	29.58
<i>Lactococcus</i>	8752	14.21
Unclassified at Genus level	7906	12.83
<i>Acidobacterium</i>	6114	9.92
<i>Ralstonia</i>	3257	5.29
<i>Clostridium</i>	2065	3.35
<i>Staphylococcus</i>	2060	3.34
<i>Oerskovia</i>	1815	2.95

Таким образом, в процессе восстановления почвенного покрова после осушения содового шламохранилища выявлены значительные изменения в составе микробиоценоза. В отличие от данных по составу микрофлоры щелочных озер естественного происхождения [Зайцева и др. / Zaytseva et al, 2014, Турова и др. / Turova et al., 2014], где доминирующими группами микроорганизмов были *Betaproteobacteria* и *Bacteroidetes*, в исследованных микробиоценозах щелочных биотопов антропогенного происхождения преобладали представители *Gammaproteobacteria* и *Firmicutes*.

Литература / References

1. Blinov S.M., Maksimovich N.G., Naydanova N.F., Shlykov V.G., Potapov S.S. Mineralogicheskie osnovy utilizatsii otkhodov ОАО «Bereznikovskiy sodovyy zavod». *Mineralogiya tekhnogeneza*. 2003. Т. 4. S. 51-55. (In Russian - Блинов С.М., Максимович Н.Г., Найданова Н.Ф., Шлыков В.Г., Потапов С.С. Минералогические основы утилизации отходов ОАО

«Березниковский содовый завод». *Минералогия техногенеза*. 2003. Т. 4. С. 51-55)

2. Glover D.M. (Ed.) *DNA Cloning. A Practical Approach. Volume I, II*. Pp. 190 and 245. IRL Press, Oxford. 1985. (In Russian - *Клонирование ДНК. Методы*. Пер. с англ.; под ред. Д. Гловера. - М.: Мир, 1988. 538 с.)

3. Grant W.D. Alkaline environments and biodiversity. *Extremophiles*. Gerday E.C., Glansdorff N. Oxford, UK: UNESCO, Eolss Publishers, 2006.

<http://www.eolss.net/ebooks/sample%20chapters/c03/e67-3-05-01.pdf>

4. Tourouva T.P., Sorokin D.Y., Grechnikova M.A., Kuznetsov B.B. Phylogenetic diversity of bacteria in soda lake stratified sediments. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2014. 83(6). С. 869-879. DOI:

10.1134/S0026261714060186 (In Russian - Турова Т.П., Гречникова М.А., Кузнецов Б.Б., Сорокин Д.Ю. Исследование филогенетического разнообразия бактерий в стратифицированных осадках содовых озер. *Микробиология*. 2014. 83(6). С. 730-742. DOI: 10.7868/S0026365614060196)

5. Zaitseva S.V., Abidueva E.Y., Namsaraev B.B., Wang L., Wu L. Microbial community of the bottom sediments of the brackish Lake Beloe (Transbaikal Region) *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2014. 83(6). P. 861-868. DOI: 10.1134/S0026261714060216 (In Russian -

Зайцева С.В, Абидуева Е.Ю., Намсараев Б.Б., Ванг Л., Ву Л. Микробное сообщество донных осадков солоноватого щелочного озера Белое (Забайкалье). *Микробиология*. 2014. 83(6). С. 722-729. DOI: 10.7868/S0026365614060226)