

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО И ТАКСОНОМИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ЧЁРНОГО МОРЯ МЕТОДОМ NGS

О. И. Белых¹, В. С. Муханов², А. Ю. Краснопеев¹, О. А. Рылькова², Т. В. Бутина¹,
И. В. Тихонова¹, Е. Г. Сахонь², С. А. Потапов¹

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, РФ, belykh@lin.irk.ru

²Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН,
Севастополь, РФ

Методом массового параллельного секвенирования фрагмента гена 16S рРНК (NGS – next-generation sequencing) исследован бактериопланктон (включая фильтрующиеся формы) Севастопольской бухты (Чёрное море), р. Чёрная (юго-западный Крым) и гиперсолёного озера на мысе Херсонес (юго-западный Крым). Выявлены значительные различия в генетическом и таксономическом составе микробных сообществ из разных биомов и размерных фракций (пико >0.2 мкм и фемто <0.2 мкм).

Ключевые слова: бактериопланктон, Чёрное море, 16S рРНК, филоотипы, метагеномный анализ

Бактериопланктон играет ключевую роль в процессах круговорота вещества и энергии в водных экосистемах. Автотрофный пикопланктон создает до 90% первичной продукции в морях и океанах [1], за счет деструкционной деятельности бактерий в морских экосистемах утилизируется 40–80% органического углерода, создаваемого первичными продуцентами [2, 3]. Однако до 1990-х гг. знания о биоразнообразии водных бактерий ограничивались культивируемыми штаммами. В то же время было известно, что до 99% бактерий не культивируется [4].

Применение молекулярных методов, в частности, полимеразной цепной реакции, дало возможность исследовать состав микробного сообщества в природных образцах без культивирования [5, 6]. Широкое использование в качестве маркера гена 16S рРНК позволило получить большое количество последовательностей и выявить огромное разнообразие планктонных бактерий [7]. В последнее время прорывом в исследовании состава и метаболического потенциала микроорганизмов стало применение методов секвенирования нового поколения (NGS – next-generation sequencing) [8]. Метагеномный анализ сообщества – новый подход, предназначенный для изучения видового разнообразия микробного сообщества и, в частности, позволяющий проводить эффективное сравнение микробиоты из разных биомов. Цель данного исследования заключалась в оценке и сравнительном анализе генетического и таксономического разнообразия бактериопланктона различных биомов (пресноводного, морского, гиперсолёного) методами массового параллельного секвенирования и биоинформационного анализа.

Материал и методы. Пробы бактериопланктона отбирали в июне–июле 2015 г. в б. Севастопольская (Чёрное море), в устье р. Чёрная (юго-западный Крым) и в гиперсолёном озере на мысе Херсонес (юго-западный Крым). Бактериальные клетки из пикофракции (собственно бактериопланктон – БП, >0.2 мкм) и фемтофракции (ультрамикробактериопланктон – УМБ, < 0.2 мкм) концентрировали на поликарбонатные мембраны с диаметром пор 0.2 и 0.05 мкм, соответственно. Суммарную ДНК концентрированных образцов выделяли с помощью набора «ДНК-Сорб В» (ИнтерЛабСервис, Россия). Для амплификации использовали праймеры 343F и 806R, фланкирующие

участок V3-V4 гена 16S рРНК. Метагеномное секвенирование фрагмента гена 16S рРНК проводили на геномном секвенаторе Miseq Illumina (ЦКП «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск). Биоинформационный анализ выполняли, как описано ранее [9].

Результаты и обсуждение. Результаты изучения состава микробных сообществ с помощью методов массового параллельного секвенирования фрагмента гена 16S рРНК выявили высокое генетическое и таксономическое разнообразие микробиомов из разных биотопов и размерных фракций. Кривые насыщения на уровне кластеризации 0.03 выходили на плато, свидетельствуя, что выполненный объем секвенирования достаточен для полного описания сообщества. Количество нуклеотидных последовательностей в пробах БП достигало 14969, в УМБ – 9527, число филоотипов – 700 и 350, соответственно.

В БП из всех исследованных биотопов количество филумов составило 15–22, в УМБ – 15. В БП б. Севастопольская по числу последовательностей доминировали Proteobacteria (80%), в меньшем количестве присутствовали Bacteroidetes (14%) и Actinobacteria (4%). В р. Чёрная также преобладали Proteobacteria (69%), тогда как вклад Bacteroidetes (17%) и Actinobacteria был ниже (12%). В гиперсоленом озере соотношение мажорных филумов иное: Actinobacteria (50%), Proteobacteria (24%) и Bacteroidetes (20%). Следует отметить чрезвычайно низкий вклад цианобактерий в микробиом пикофракции (менее 4%). В УМБ Севастопольской бухты доминировали Proteobacteria (62%), в гиперсоленом озере – преобладали Actinobacteria (50%).

Среди минорных филумов обнаружено заметное количество Tenericutes (1–3%) в р. Чёрная во фракции УМБ, а в б. Севастопольская – во фракции БП. Представители филумов Gemmatimonadetes, Acidobacteria, Planctomycetes, Chlorobi, Chloroflexi, Nitrospirae, Armatimonadetes во всех биотопах встречались в единичном числе, однако в пресных водах они были более многочисленны. Наоборот, в черноморской воде обнаружены филумы Omnitrophica, Microgenomates, причем редкие филумы Candidate division SR1, Gracilibacteria, Saccharibacteria, Parcubacteria, TM6 были определены в большем количестве, чем, например, в озере Байкал (наши данные).

По количеству OTU в б. Севастопольская и в р. Чёрная в БП преобладали филоотипы Candidatus Pelagibacter, AEGEAN-169 marine group, морские клады группы SAR, NS3a marine group, Candidatus Aquiluna. Среди УМБ помимо этих групп обильными были Serratia. UPMGA-анализ генетического состава микробных сообществ выявил их достоверное отличие как по биотопам, так и по размерным фракциям.

Выводы. Таким образом, данные метагеномного анализа показали высокое генетическое и таксономическое разнообразие бактериального сообщества во всех исследованных биотопах. Фракция фильтрующихся форм бактерий (ультрамикробактерий) характеризовалась меньшим количеством последовательностей и филоотипов. Выявлены значительные различия по составу и соотношению как мажорных, так и минорных филумов в исследуемых водоемах и между фракциями. Отмечены особенности состава и структуры морского и пресноводного бактериопланктона.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-04-90421, № 16-54-44035.

1. Stockner J. G., Antia N. J. Algal Picoplankton from Marine and Freshwater Ecosystems: A Multi-disciplinary Perspective // *Canadian J. Fisheries and Aquatic Sciences*. 1986. Vol. 43, № 12. P. 2472–2503.

2. Whitman W. B. Prokaryotes: The unseen majority / Eds. W. B. Whitman, D. C. Coleman, W. J. Wiebe // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95, № 12. P. 6578–6583.
3. Ducklow H. The bacterial component of the oceanic euphotic zone // *Microb. Ecol.* 1999. Vol. 30, № 1. P. 1–10.
4. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. Phylogenetic Identification and in situ Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation // *Microb. Rev.* 1995. Vol. 59. P. 143–169.
5. Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L., Field K. J. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton // *Nature*. 1990. Vol. 345. P. 60–63.
6. Fuhrman J. A., McCallum K., Davis A. A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. Vol. 59. P. 1294–1302.
7. Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., Chai B. L., McGarrell D. M., Sun Y. N., Brown C. T., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., Tiedje J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. D633–D642.
8. Kodzius R., Gojobori T. Marine metagenomics as a source for bioprospecting // *Marine genomics*. 2015. Vol. 24, Part 1. P. 21–30.
9. Гладких А. С., Калюжная Ок. В., Белых О. И., Ан Т. С., Парфенова В. В. Анализ бактериального сообщества двух эндемичных видов губок из озера Байкал // *Микробиология*. 2014. Т. 83, № 6. С. 1–12.

GENETIC AND TAXONOMIC ANALYSIS OF THE BLACK SEA BACTERIOPLANKTON DIVERSITY USING NGS

O. I. Belykh¹, V. S. Mukhanov², A. Yu. Krasnopeev¹, O. A. Rylkova², T. V. Butina¹,
I. V. Tikhonova¹, Ye. G. Sakhon², S. A. Potapov¹

¹Limnological Institute, SD RAS, Irkutsk, RF, belykh@lin.irk.ru

²Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, RAS, Sevastopol, RF

The next-generation sequencing (NGS) approach has been applied to sequence 16S rRNA gene fragments in a massively parallel way in bacterioplankton samples from Sevastopol Bay (the Black Sea), the Black river estuary (SW Crimea) and a hypersaline lake at Khersones cape (SW Crimea). Significant differences have been revealed in genetic and taxonomic diversity of the microbial communities from different biomes and size fractions (pico >0.2 µm versus femto <0.2 µm).

Keywords: bacterioplankton, Black Sea, 16S rRNA, phylotypes, metagenomic analysis