

УДК 574.583:574.47(262.54)

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА АЗОВСКОГО МОРЯ

© 2015 г. Д. Г. Матишов¹, В. В. Стахеев¹, Е. Л. Чирак², Г. Ю. Глущенко¹

¹Институт аридных зон Южного научного центра Российской академии наук, Ростов-на-Дону
e-mail: dmatishov@mail.com

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 24.03.2014 г., после доработки 26.06.2014 г.

С использованием методов множественного параллельного секвенирования проведена оценка таксономического состава микроорганизмов Азовского моря. Показан реальный уровень биологического разнообразия микроорганизмов. Установлено, что по своей структуре прокариотное сообщество на всей акватории Азовского моря, включая Таганрогский залив, имеет типичные черты морского. Несмотря на мелководность водоема, сообщества микроорганизмов в Азовском море отчетливо дифференцированы на поверхностные и придонные кластеры.

DOI: 10.7868/S0030157415050123

Водная микрофлора — является важнейшим звеном функционирования водных экосистем, осуществляет трансформацию органических и минеральных веществ, во многом определяет первичную продукцию. Азовское море — высокопродуктивный водоем, изучение микрофлоры которого имеет уже почти столетнюю историю: первые сведения, характеризующие бактериальное население вод и донных отложений этого моря, были получены еще Книповичем [3], а позднее Исаченко [2], Буткевичем [1], Цыбань и Домчинской [6]. Применение методов молекулярной биологии, наряду с классическими микробиологическими подходами, открыло новые возможности исследования санитарно-микробиологического и экологического состояния воды и рыб Азовского моря. На основе секвенирования фрагментов генов были идентифицированы бактерии, выделенные методом посева из проб, взятых в Керченском проливе (12 штаммов) и предпроливье (5 штаммов), а также в одном из лиманов Азовского моря [12, 5, 4]. Всего к настоящему времени в микрофлоре вод и донных отложений Азовского моря описано 73 таксона родового и видового ранга, что, конечно же, не отражает истинного уровня биологического разнообразия бактериопланктона этого водоема.

В последнее десятилетие в практику океанологических исследований активно внедряются методы геномного анализа [10, 11, 17, 15]. Результаты этих исследований позволили выявить некультивируемые микроорганизмы, составить более полное представление о функционировании морских экосистем, раскрыть особенности путей трансформации основных биогенных элементов.

В представленной работе мы попытались дать общую характеристику метагенома микробиоты Азовского моря, определить таксономический состав бактериопланктона, играющего важную роль в функционировании экосистемы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили 10 проб воды, отобранные на пяти станциях с борта НИС “Денеб” 9–10 августа 2012 г. с поверхностного и придонного водных горизонтов из разных районов моря (рис. 1). Пробы с поверхности отбирали путем зачерпывания воды, с придонного горизонта — с использованием батометра Молчанова объемом 200 мл. Координаты станций отбора проб, их основные экологические параметры приведены в таблице.

Фиксацию проводили 80%-ным этанолом, до выделения ДНК хранили в холодильнике при +4°C. Выделение ДНК проводили по методике ферментативного лизиса с использованием лизоцима и протеиназы с последующей фенол-хлороформной экстракцией [18].

Таксономический анализ проводили на основе варибельного участка V4 гена 16S рРНК. Для ПЦР-реакции применяли универсальные праймеры F515 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806 GGACTACVSGGGTATCTAAT [7] с добавлением олигонуклеотидных идентификаторов для каждой пробы (20 штук) и служебных последовательностей, необходимых для пиросеквенирования по протоколу компании Roche. Используемые праймеры были сконструированы на основе анализа последовательностей как бактерий,

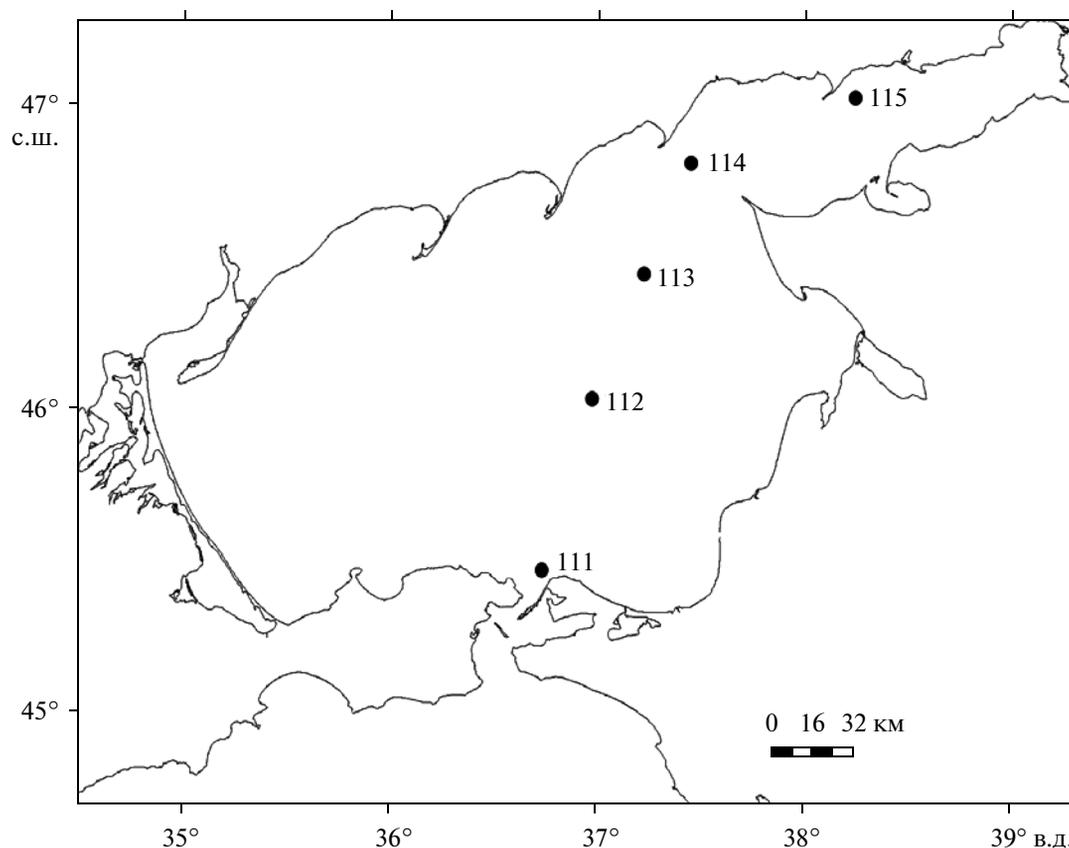


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб.

так и архей. Параллельное множественное секвенирование проводили на приборе GS Junior (Roche, USA) согласно рекомендациям производителя. Полученные библиотеки депонированы в БД “Short Reading Archive” (таблица).

Компьютерную обработку полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей, удаление из их состава меток и

праймеров осуществляли согласно методическим рекомендациям в приложении Ribosomal Database Project (RDP) Pipeline [8]. С использованием программы MOTHUR версии 1.22.2 [19] проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей, построение матрицы генетических расстояний и кластерный анализ последовательностей с применением алгоритма average neighbor.

Координаты станций и гидрохимические характеристики отобранных проб

№ станции	Координаты, град	№ пробы	Глубина, м	Индекс Шеннона	Индекс ChaoI	Идентификатор SRA
111	45.48621 с.ш. 36.74765 в.д.	111п	0	2.84	107.46	SRS622927
		111пр	9.4	2.94	87.5	SRS622928
112	46.03707 с.ш. 36.98490 в.д.	112п	0	3.17	105.03	SRS622929
		112пр	11.0	3.06	87.8	SRS622930
113	46.44108 с.ш. 37.22268 в.д.	113п	0	2.81	100.05	SRS622931
		113пр	10.0	2.97	73.56	SRS622932
114	46.80628 с.ш. 37.45562 в.д.	114п	0	2.71	99	SRS622933
		114пр	6.0	2.95	77.72	SRS622934
115	47.01557 с.ш. 38.74288 в.д.	115п	0	3.27	104	SRS622935
		115пр	5.0	2.82	118.17	SRS622969

Примечание: п – поверхностные пробы, пр – придонные пробы.

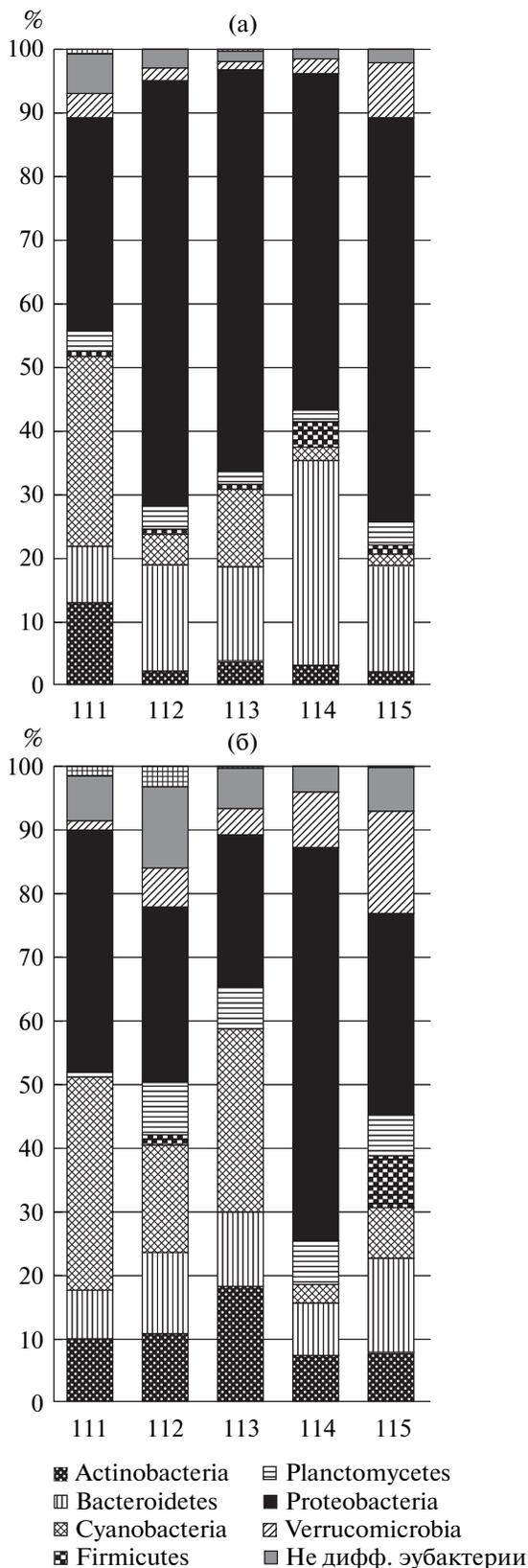


Рис. 2. Доля различных бактериальных филогрупп в микрофлоре Азовского моря: (а) – поверхностный, (б) – придонный горизонт.

Далее проводили классификацию последовательностей на OTU (Operational Taxonomic Unit) с использованием критерия 97% сходства, вычислением индекса разнообразия Шеннона (H') и индекса обилия $ChaoI$, которые позволяют судить об уровне биоразнообразия в сообществе и полноте его анализа: сравнение предполагаемого количества OTU при данных параметрах выборки с количеством экспериментально выявленных OTU [9].

Таксономическую идентификацию нуклеотидных последовательностей и сравнительный анализ микробных сообществ проводили с использованием Интернет-ресурса VAMPS (Visualization and Analysis of Microbial Population Structures), доступного на сайте <http://vamps.mbl.edu/>. Классификацию последовательностей осуществляли с использованием базы данных RDP (Ribosomal Database Project). На основе использования сайта VAMPS были получены таблицы, содержащие значение доли идентифицированных микроорганизмов в каждой пробе. Для построения дендрограммы родства микробных сообществ был проведен кластерный анализ последовательностей из всех проб с использованием алгоритма UPGMA и индекса Morisita-Horn.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ геномных фрагментов позволил выявить в метагеноме микроорганизмы, относящиеся к одному отделу архей и к 12 отделам, 26 классам, 47 порядкам, 78 семействам, 259 родам эубактерий.

Основу прокариотного сообщества Азовского моря в период проведения работ составляли представители отделов Proteobacteria (от 23.95 до 66.41%), Bacteroidetes (от 7.37 до 32.15%) и Cyanobacteria (от 1.62 до 33.62%). В отдельных пунктах отмечена высокая доля бактерий отделов Actinobacteria (до 18.45%), Firmicutes (до 8.18%), Planctomycetes (0.89–8.41%) и Verrucomicrobia (до 15.88%) (рис. 2).

Среди Proteobacteria доминируют представители классов Gammaproteobacteria (10.69–55.51%) и Alphaproteobacteria (4.40–16.02%). Гаммапротеобактерии являются хемогетеротрофами и их доля заметно выше в Таганрогском заливе и в центральной части Азовского моря, чем в предпроливье – участке, менее богатом взвешенными органическими веществами. В этой группе преобладают (на отдельных станциях) роды *Hailea*, *Pseudidiomarina*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Neptuniibacter* и *Psychrobacter*, характерные для морских экосистем. Удивительно наличие в Азовском море рода *Psychrobacter* – бактерий обычно обитающих в холодных экосистемах. Микроорганизмы этой группы обнаружены преимущественно в поверхностных горизонтах и на отдельных

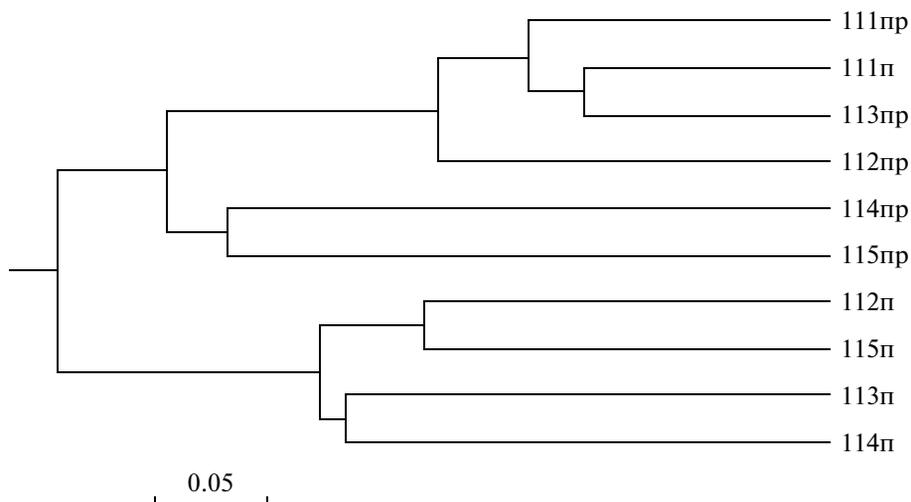


Рис. 3. Дендрограмма сходства микробных сообществ в разного типа пробах из Азовского моря (обозначения п и пр те же, что и в таблице).

станциях составляли от 1.67 до 27.61% (в среднем 12.45%).

Альфапротеобактерии представлены в сообществе относительно равномерно на акватории Азовского моря с преобладанием в поверхностном горизонте, что может быть обусловлено автотрофными свойствами этой группы. Существенный вклад вносят бактерии родов *Pelagibacter* и *Erythrobacter*, доля которых возрастает в пробах по направлению от Керченского пролива к устью Дона, что по-видимому коррелирует с различными требованиями к содержанию органического вещества. Гетеротрофные бактерии *Pelagibacter* отличаются невысокой требовательностью к наличию свободного азота. Эритробактерии – фотогетеротрофы, содержащие бактериохлорофилл *a* и способные обеспечить значительную часть своих метаболических потребностей за счет фотосинтеза.

Филогруппа *Bacteroidetes* объединяет гетеротрофных бактерий, обладающих широким спектром физиологических адаптаций, что позволяет им осваивать разнообразные экологические ниши, а мультиферментные системы обеспечивают утилизацию разнообразных субстратов в качестве источников углерода и энергии.

В микрофлоре Азовского моря широко представлены бактерии класса *Flavobacteria*, составляющие от 1.57 до 30.40% на отдельных станциях. В поверхностном горизонте значительную долю составляют также флавобактерии рода *Gramella*, относительное содержание которых увеличивается по направлению к Таганрогскому заливу. Бактерии этого рода играют важную роль в процессах биodeградации высокомолекулярных соединений.

Отдел *Cyanobacteria* представлен единственным одноименным классом, в составе которого выделялось 4 рода одноклеточных организмов,

точную идентификацию которых с помощью ресурса VAMPS провести не удалось. При этом практически все обилие цианобактерий определялось только одним из них. Прочие три не вносили существенного вклада. Необходимо отметить удивительный факт большего доминирования в количественном отношении цианобактерий в районе Керченского пролива и в центральной части Азовского моря по сравнению с Таганрогским заливом.

В составе актиномицетов преобладали представители порядка *Actinomycetales* – аэробы, участвующие в биodeградации сложных органических субстратов. Среди *Firmicutes* наибольшая доля принадлежит бактериям класса *Bacilli*, удельный вес которых в бактериопланктоне особенно заметен в Таганрогском заливе. Из *Verrucomicrobia* доминирует класс *Spartobacteria*, численность которого также возрастает в Таганрогском заливе. Наличие большого количества генов гидролаз гликозидов указывает на важную роль *Spartobacteria* в углеродном цикле. Существует предположение, что эти микроорганизмы ассоциированы с цианобактериями на поздних стадиях “цветения” воды [16], что определяет их особое значение в Азовском море.

Филогруппа *Planctomycetes* представлена шестью родами семейства *Planctomycetaceae*, с преобладанием не дифференцированного таксона. Планктомицеты выявлены преимущественно в придонном горизонте, где они играют важную роль в цикле азота, метаногенезе и метилотрофии [13, 14].

Анализ пространственной структуры бактериопланктона (рис. 3) демонстрирует отчетливую дифференциацию бактериальной биоты на сообщества поверхностного и придонного водных го-

ризонтов на всей акватории Азовского моря, за исключением поверхностной пробы из Керченского предпроливья, схожей с придонными. Этот факт возможно связан с заносом поверхностных вод в придонный горизонт, что в условиях Керченского пролива является обычным событием.

В результате сравнительного таксономического анализа были выявлены маркерные таксоны: роды *Marinomonas*, *Loktanella*, *Persicivirga*, *Nephtinomonas*, *Planomicrobium* характерны для поверхностных сообществ, в то время как *Shewanella* встречается исключительно в придонных водах. Важной характеристикой придонных сообществ является их более высокое разнообразие как по таксономическому богатству (индекс Чао), так и по индексу разнообразия Шеннона (таблица).

В поверхностных водах по сравнению с придонными преобладают актинобактерии, альфа-протеобактерии, представители родов *Psychrobacter*, *Erythrobacter*, *Gramella*, в то время, как в глубинном горизонте отмечена высокая доля планктомицетов и спартобактерий.

Таким образом, с использованием метагеномного анализа показано, что бактериопланктон на всей акватории Азовского моря, включая Таганрогский залив, имеет типичные черты морского сообщества, а именно доминирование представителей порядков Bacteroidetes и Proteobacteria с преобладанием Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria, а также с заметной долей в сообществе поверхностных вод бактерий родов *Pseudoalteromonas* и *Alteromonas*, что характерно и для Средиземного моря [20].

Следует отметить, что несмотря на мелководность водоема, сообщества микроорганизмов в Азовском море отчетливо дифференцированы на поверхностные и придонные кластеры.

Перспективным направлением дальнейших исследований является анализ экологических факторов, ответственных за пространственную дифференциацию микробных сообществ Азовского моря, изучение сезонной динамики метагенома, его роли в циркуляции органического вещества и энергии.

Авторы выражают признательность Д.И. Володажскому за помощь в проведении лабораторных работ, особую благодарность академику С.В. Шестакову за внимательное отношение к статье и ценным советам и замечаниям, высказанным при ее подготовке.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Отделения наук о Земле РАН № 13 “Географические основы устойчивого развития РФ и ее регионов”: “Влияние экосистемных перестроек на биоту Азовского и Каспийского бассейнов в процессе изменения климата и антропогенного воздействия”, № гос. регистрации 01201261869, базовой

темы НИР “Современное состояние и многолетняя изменчивость прибрежных экосистем южных морей России”, № гос. регистрации 01201363187.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буткевич В.С. О бактериальном населении Каспийского и Азовского морей // Микробиология. 1938. Т. 7. № 9–10. С. 1005–1021.
2. Исаченко Б.Л. Микроскопический анализ грунтов Азовского и Черного морей // Записки гос. гидролог. ин-та. 1933. Вып. 10. С. 377–388.
3. Книпович Н.М. Работы Азовской научно-промышленной экспедиции в 1922–1924 гг. (предварительный отчет) // Тр. Азово-Черноморской научно-промышленной экспедиции. 1926. Вып. 1. С. 3–64.
4. Сазыкин И.С. Роль процессов свободнорадикального окисления в микробиологической деградации нефти: Автореф. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2012. 24 с.
5. Сазыкина М.А., Коленко М.А., Чистяков В.А., Низова Г.А. Санитарно-микробиологическое состояние рыбы в Азовском и Черном морях в 2007 г. // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна: Сб. науч. тр. Ростов-на-Дону, 2008. С. 110–117.
6. Цыбань А.В., Домчинская Т.В. Сапрофитная микрофлора Азовского моря // Гидроб. журн. 1974. Т. 10. № 4. С. 5–13.
7. Bates S.T., D. Berg-Lyons J.G., Caporaso W.A. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // ISME J. 2010. № 5. P. 908–917.
8. Cole J.R., Wang Q., Cardenas E. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. 2009. № 37. P. D141–D145.
9. Colwell R.K. Biodiversity: Concepts, Patterns and Measurement // The Princeton guide to ecology / Ed. Levin S.A. et al. Princeton.: Princeton University Press, 2009. P. 257–263.
10. DeLong E.F. Microbial community genomics in the ocean // Nat Rev Microbiol. 2005. № 3. P. 459–469.
11. DeLong E.F., Karl D.M. Genomic perspectives in microbial oceanography // Nature. 2005. № 437. P. 336–342.
12. Dronina N.V., Tourova T.P., Trotsenko Y.A. *Methylarcula marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylarcula terricola* sp. nov.: novel aerobic, moderately halophilic, facultatively methylotrophic bacteria from coastal saline environments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1849–1859.
13. Fuchsman C.A., Staley J.T., Oakley B.B. et al. Free-living and aggregate associated Planctomycetes in the Black Sea // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 80. P. 402–416.
14. Fuerst J., Sagulenko E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function // Nature Reviews Microbiology. 2013. V. 9. P. 403–413.

15. *Gilbert J.A., Field D., Swift P. et al.* The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel // *Environmental Microbiology*. 2009. № 11(12). P. 3132–3139.
16. *Herlemann D.P.R., Lundin D., Labrenz M. et al.* Metagenomic de novo assembly of an aquatic representative of the verrucomicrobial class Spartobacteria // *mBio*. 2013. V. 4. Is. 3. e00569-12
17. *Rusch D.B., Halpern A.L., Sutton G. et al.* The *Sorcerer II* Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific // *PLoS Biol.* 2007. № 5(3). P. 0398–0431.
18. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989. 479 p.
19. *Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 23. № 75. P. 7537–7541.
20. *Zaballos M., Lopez-Lopez A., Ovreas L. et al.* Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006. V. 56. P. 389–405.

Metagenomic Analysis of the Bacterial Community from the Sea of Azov

D. G. Matishov, V. V. Stakheev, E. L. Chirak, G. Yu. Glushchenko

The taxonomic composition of microorganisms in the Sea of Azov was assessed using the methods of multiple parallel sequencing. The true level of biological diversity of microorganisms was shown. It was established that the structure of prokaryotic community throughout the Sea of Azov, including Taganrog Bay, has the typical features of a marine one. Despite the shallowness of the water body, microbial communities in the Sea of Azov are clearly distinguished between the surface and bottom clusters.