

ОБСТЕЖЕННЯ І МОНІТОРИНГ МЕЛІОРОВАНИХ І ЗАБРУДНЕНИХ ҐРУНТІВ

SURVEY AND MONITORING OF RECLAIMED AND CONTAMINATED SOILS

УДК 576.26:577.2.08:579.64:631.46

Сучасні молекулярно-біологічні методи вивчення мікробного біому та метабеному ґрунтів аграрного використання

М.В. Патица¹, О.Ю. Колодяжний^{1*}, Ю.П. Борко²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

²Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН», Чабани, Київська обл., Україна

ІНФОРМАЦІЯ	АНОТАЦІЯ
<p>Отримано 08.05.2017 Отримано після доопрацювання 24.05.2017 Затверджено до друку 15.11.2017 Доступно онлайн 05.12.2017</p> <hr/> <p><i>Ключові слова:</i></p> <p><i>Мікроорганізми; Мікробний біом; Метагеном; ДНК; Ґрунт; Біорізноманіття; Молекулярно-біологічні методи.</i></p>	<p>Завдяки потужному розвитку молекулярно-біологічних методів з'явилася можливість досліджувати видову структуру змішаних культур та асоціацій мікроорганізмів у таких складних природних середовищах, як вода та ґрунт, не виділяючи їх у чисту культуру. За останні десятиліття розроблено низку підходів, що засновані на аналізі нуклеїнових кислот після прямого екстрагування із зразків ґрунту. Тому, метою роботи було характеризувати сучасні молекулярно-біологічні методи та підходи, застосування яких відкриває нове розуміння щодо філогенетичного та функціонального різноманіття мікробних угруповань у ґрунтах аграрного використання. Такі молекулярні підходи, як генетичний фінгерпринтинг, скринінг бібліотек клонованих генів, ДНК-мікрочіпи та метагеноміка вкрай важливі для об'єктивної, комплексної оцінки складу та структури мікробних угруповань ґрунту, що формуються під впливом різних агрозаходів. У статті коротко охарактеризовано досягнення останніх десятиліть у галузі молекулярної мікробної екології з акцентом на нових методах і підходах, що дозволяють виявляти реальне таксономічне різноманіття компонентів ґрунтового мікробного біому та нові функціональні гени мікроорганізмів з метою розуміння біогеохімічних процесів ґрунтоутворення та розкриття механізмів взаємодії в системі ґрунт – мікроорганізми – рослина.</p>

* E-mail: O.kolodjzhny@i.ua

1. Вступ

Мікробні угруповання ґрунту є складними системами взаємодіючих організмів, надзвичайно різноманітними і численними за кількістю видів, функціональною складовою та екологічною роллю у навколишньому середовищі. Визначення структури мікробних комплексів є невід'ємною частиною детальної характеристики ґрунтів, включаючи процеси та фактори, що прямо, чи опосередковано впливають на їх особливості. Швидка реакція мікробного різноманіття (зміна видового складу, зниження видового різноманіття, диференціація чисельності різних фізіологічних груп) на фактори впливу є надійним діагностичним показником моніторингу стану ґрунтів за різних агрозаходів та погіршення якості екосистеми в цілому [1].

Класичні мікробіологічні методи, засновані на культивуванні мікроорганізмів, є важливими для дослідження екології ґрунтових мікроорганізмів, їх функціональної активності в природних екосистемах та агрофітоценозах, але вони мало інформативні в оцінці мікробного генетичного різноманіття шляхом відбору певної популяції мікроорганізмів [2].

З урахуванням останніх досягнень у галузі геноміки та технологій секвенування аналіз мікробного угруповання з використанням незалежних від культивування молекулярних методів поклав початок новій ері дослідження екології ґрунтових мікроорганізмів. Молекулярно-біологічні дослідження показали, що форми, які культивуються на поживних середовищах становлять 1–10 % від загальної кількості прокариотних видів, присутніх у будь-якому окремому зразку ґрунту. На фоні невідомих видів, недостатнього вивчення пулу мікробних генів та генних продуктів функції більшості мікроорганізмів залишаються нез'ясованими [3].

Наразі існує багато молекулярних методів, заснованих на прямій екстракції та

аналізі нуклеїнових кислот, білків та ліпідів із зразків ґрунту, що дозволяють досліджувати видову структуру змішаних культур та асоціацій мікроорганізмів, виявляти повне біорізноманіття та таксономічний поліморфізм всіх компонентів ґрунтового мікробного біому, незалежно від можливості їх культивування на поживних середовищах [4].

Останніми десятиліттями розроблено нові молекулярно-біологічні методи ідентифікації мікроорганізмів і створено філогенетичну систематику їх класифікації [5, 6]. Разом з цим, з'явилася можливість досліджувати якісну та кількісну структури мікробних угруповань у таких складних природних середовищах, як вода та ґрунт, не виділяючи їх у чисту культуру [7].

Якщо взяти до уваги колосальний розмір ґрунтового мікробного біому (до 10^{9-12} клітин на г ґрунту) і його таксономічне різноманіття (до 10 тис. операційних таксономічних одиниць), стає очевидним, що ґрунтова мікробіологія тільки сьогодні отримала доступ до реального вивчення мікробіоти у всій її повноті [8, 9].

Одним із наймасштабніших світових проєктів з вивчення різноманіття природних мікробіомів є проєкт "Earth Microbiome Project", що спрямований на аналіз ґрунтового мікробного біому по всьому світу та створення міжнародної "мікробної біокарти" [10].

Молекулярні підходи, такі як генетичний фінгерпринтинг, метагеноміка, метапротеоміка, метатранскриптоміка і протеогеноміка є життєво важливими для виявлення і характеристики великого розмаїття мікроорганізмів і розуміння їх взаємодії з біотичними та абіотичними факторами навколишнього середовища [2].

Але дослідження структури біому та метагеному мікробних угруповань ґрунтів аграрного використання із застосуванням молекулярно-біологічних методів мають здебільшого фрагментарний характер, оскільки на сьогодні методичне забезпечення є недостатнім. Тому у більшості робіт відсутня характеристика типу ґрунту, рослинного покриву, ландшафту, природно-кліматичних умов та агротехнічних прийомів обробітку сільськогосподарських культур, що обумовлює функціонування та формування мікробних угруповань, їх структури та біорізноманіття. У зв'язку з цим, важко провести будь-який порівняльний аналіз даних за таксономічної та філотипової структури прокаріотних комплексів ґрунтових мікроорганізмів в агроєкосистемах, отриманих різними дослідниками. Таким чином, виникає необхідність організації комплексних системних досліджень структури та біорізноманіття метагеному угруповань ґрунтових мікроорганізмів, що формуються в умовах різних природно-кліматичних зон, пов'язавши їх з характерними особливостями біогеохімічних процесів ґрунтоутворення та особливостями вирощування культур [11].

Зважаючи на вищевикладене, метою роботи було характеризувати сучасні молекулярно-біологічні методи та підходи, застосування яких відкриває нове розуміння філогенетичного та функціонального різноманіття мікробних угруповань ґрунтів аграрного використання. Навести переваги і недоліки загальноприйнятих молекулярних методів, перспективи застосування кожної молекулярної методики і способи їх комбінування для більш повної оцінки біому та метагеному мікробних угруповань ґрунту.

2. Виклад основного матеріалу

Мікроорганізми забезпечують істотний внесок у формування органічної речовини нашої планети та її біомаси; їх частка становить близько 0,001 – 0,300 % від усіх відповідних видів діяльності, в яких вони беруть участь [12]. Здебільшого не враховується той факт, що прокаріоти є найбільш різноманітними представниками живих істот на Землі [13]. Однак більша частина природних угруповань бактерій та архей не здатна рости в лабораторних умовах на елективних живильних середовищах. Це відбувається з декількох причин: відомі види, для яких не підходять застосовувані умови культивування або вони вступили в латентну фазу; невідомі види, які ніколи не культивувалися, перш за все через відсутність методичних підходів [12]. Тому основним джерелом інформації для видів, що не культивуються є їх біомолекули (нуклеїнові кислоти, ліпіди та білки).

Підходи, що засновані на дослідженні нуклеїнових кислот, включають аналіз цілих геномів, окремих генів (16S і 18S рибосомальної РНК – рРНК) або внутрішньогенних регіонів (ITS-фрагменти). Ґрунтуючись на порівняльному аналізі цих сигнатур рРНК, біорізноманіття клітинних організмів поділяється на три первинних домени: один еукаріотичний (*Eukarya*) і два прокаріотичних (*Bacteria* та *Archaea*) [14].

За останні кілька десятиліть у сфері мікробної екології було досягнуто величезного прогресу, для опису і характеристики філогенетичного і функціонального різноманіття

мікроорганізмів розроблено різноманітні молекулярні методи (рис. 1). У широкому сенсі їх можна класифікувати за двома основними категоріями залежно від їх здатності розкривати структуру і функції: методи аналізу окремих елементів угруповання та методи аналізу всього угруповання [2].

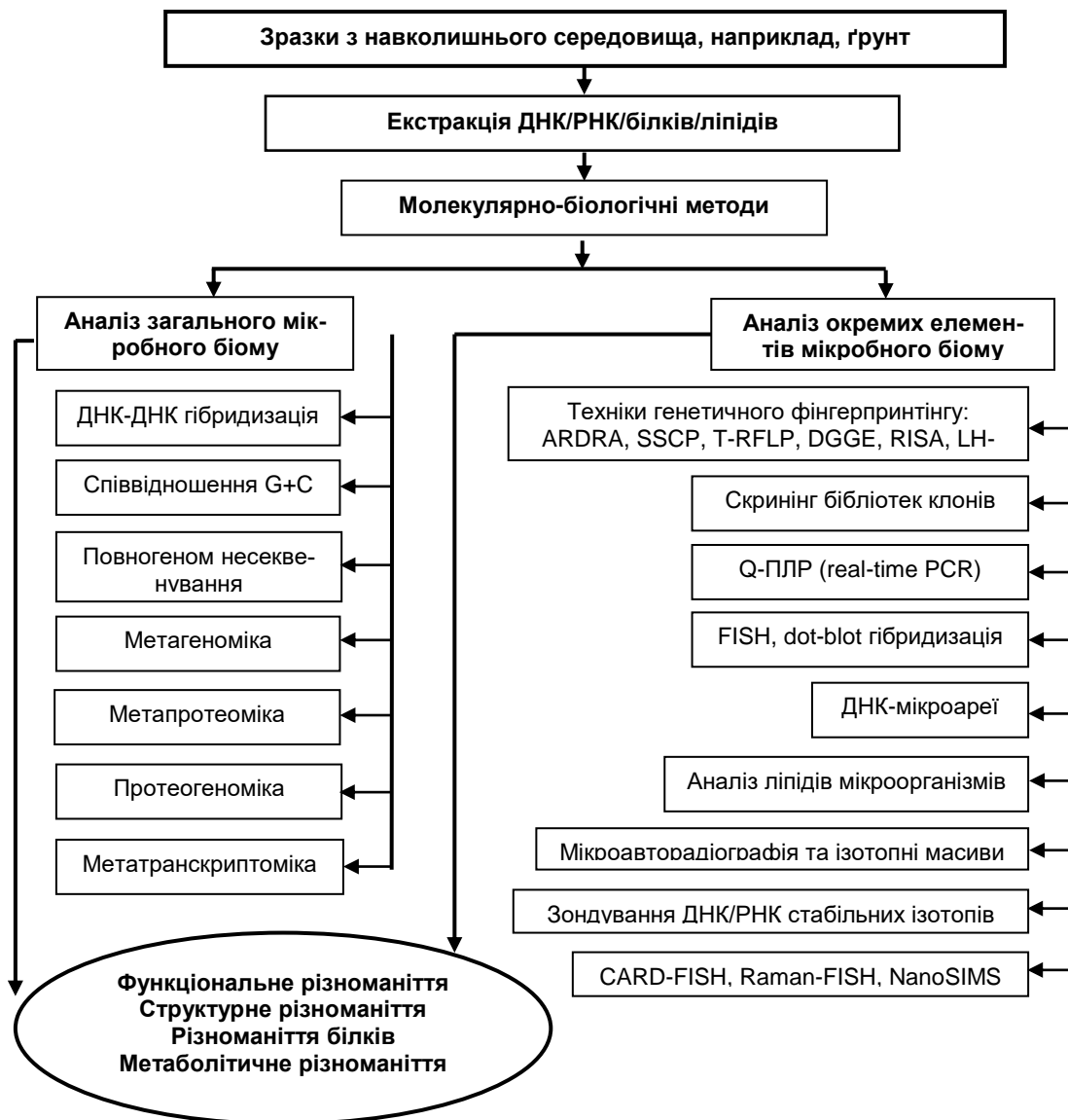


Рис. 1. Незалежні від культивування молекулярно-біологічні методи вивчення структурного та функціонального різноманіття мікроорганізмів у навколишньому середовищі

Сучасні роботи з вивчення структури та біорізноманіття ґрунтової мікрофлори базуються на виділенні нуклеїнових кислот (рДНК та рРНК) всіх живих організмів із різних типів ґрунтів та подальшому їх аналізуванні [3].

Стратегії вивчення окремих елементів мікробного біому зазвичай включають методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), у яких загальна ДНК/РНК, екстрагована із зразка ґрунту, використовується як матриця для характеристики мікроорганізмів. Продукт ПЛР, отриманий таким чином, відображає суміш сигнатур генів всіх мікроорганізмів, присутніх у зразку. ПЛР-ампліфікація окремих консервативних генів, таких як 16S рРНК, використовується найбільш часто, оскільки ці гени є масовими, тобто, присутні у всіх прокариот, структурно і функціонально зберігаються, містять варіабельні і висококонсервативні регіони [14]. Крім того, відповідний розмір гена (~ 1500 п.н.) і постійно зростаюче число доступних для порівняння в базах NCBI, RDP-II, Greengenes послідовностей гена 16S рРНК, роблять його «золотим стандартом» вибору в екології мікроорганізмів. Оцінюючи філогенетичні зв'язки з відомими мікроорганізмами, засновані

на гомології послідовностей 16S рРНК, ідентифікується найближча приналежність нового ізоляту або молекулярної послідовності [15].

Продукти ПЛР, ампліфіковані із загальної ДНК, аналізуються в основному за допомогою генетичного фінгерпринтингу, скринінгу бібліотек клонів, мікрочіпів ДНК або комбінацією цих методів.

2.1. Методи генетичного фінгерпринтингу

Генетичний фінгерпринтинг формує профіль мікробних угруповань на основі прямого аналізу продуктів ПЛР, ампліфікованих із загальної ДНК [16]. Ці методи включають в себе DGGE/TTGE, SSCP, RAPD, ARDRA, T-RFLP, LH-PCR, RISA, RAPD і створюють відбиток прокаріотного комплексу, що ґрунтується на поліморфізмі послідовностей, або на поліморфізмі довжин фрагментів. Загалом, методи генетичного фінгерпринтингу є швидкими та дозволяють проводити одночасний аналіз кількох зразків. Розроблені підходи для демонстрації впливу на мікробні угруповання відмінностей між ними без прямої таксономічної ідентифікації.

Денатуруючий та температурний градієнтний гель-електрофорез. Д

ва аналогічні методи для вивчення мікробних угруповань. У денатуруючому градієнтному гель-електрофорезі (DGGE) продукти ПЛР отримують з використанням універсальних праймерів на послідовності рибосомальних генів 16S або 18S рРНК і піддають електрофорезу на поліакриламідному гелі, що містить лінійний градієнт денатуруючої ДНК у суміші сечовини і формаміду. Гель-електрофорез з градієнтом температури (TTGE) ґрунтується на тому ж принципі, що й DGGE-метод, але замість хімічної денатурації застосовується градієнт температури. Зміна послідовності серед різних ПЛР-ампліконів визначає поведінку плавлення, і тому амплікони з різними послідовностями припиняють мігрувати в різних положеннях у гелі [11].

За обох методів використовується прямий праймер, що містить на 5'-кінці GC-кламп розміром 30–50 пар нуклеотидів [17]. Це необхідно для запобігання повної дисоціації дволанцюгової ДНК на окремі ланцюги під час електрофорезу. Теоретично методом DGGE можна розділити ДНК з відмінностями в 1 парі нуклеотидів.

Для філогенетичної ідентифікації фінгерпринтів DGGE/TGGE смуги вирізають з гелю, повторно ампліфікують та секвенують або промочують на нейлонових мембранах і гібридизують з молекулярними зондами, специфічними для різних таксономічних груп [18].

Перевагами методів DGGE/TGGE є їх надійність, здатність повторно відтворюватись, швидкість проведення і доволі доступна вартість. Можливе проведення аналізу декількох зразків одночасно, що дає змогу стежити за змінами в мікробних популяціях [16].

Недоліками методів DGGE/TGGE є можливість деяких відхилень у проведенні ПЛР, трудомістка підготовка зразків, що може потенційно впливати на зміни у мікробних угрупованнях, і різна ефективність виходу ДНК під час її виділення [2].

Вважають, що DGGE-аналізом можна визначати тільки 1–2 % мікробної популяції, які є представниками домінантних видів мікроорганізмів, і існують у природних зразках [18]. Крім того, фрагменти ДНК із різними послідовностями можуть мати подібний характер рухливості у поліакриламідному гелі. До того ж одна смуга у гелі необов'язково може відображати один вид бактерій і у зразках з одним видом бактерій, можуть з'являтися декілька бендів через чисельність генів 16S рРНК з незначними відмінностями у послідовностях ДНК [18].

Профілі DGGE ґрунтових мікробних угруповань, отримані з використанням універсальних бактеріальних праймерів, як правило, дуже складні. Щоб подолати цю проблему, використовують груповий ПЛР-DGGE зі специфічними праймерами, націленими лише на певні фізіологічні/філогенетичні групи [19].

Випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (RAPD). Метод ґрунтується на ПЛР-ампліфікації з коротким (зазвичай десятинуклеотидним) праймером, за допомогою якого випадково реплікуються фрагменти в декількох сайтах на геномній ДНК за низької температури відпалу, зазвичай ≤ 35 °C [20]. Таким чином отримуються продукти суміші фрагментів різної довжини в одній реакції, які розділяють в агарозному або поліакриламідному гелі залежно від генетичної складності мікробних угруповань. Завдяки високій швидкості та простоті використання RAPD широко застосовують для вивчення загальної структури мікробних угруповань та диференціації близькоспоріднених видів і

штамів бактерій [20].

Метод досить чутливий до експериментальних умов (температури відпалу, концентрації $MgCl_2$), якості та кількості матричної ДНК і праймерів. Таким чином, для порівняння мікробних цензів та отримання найбільш відмінних моделей між видами або штамми необхідно оцінити кілька праймерів і умов реакції [21].

Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (RFLP). Метод засновано на варіабельності послідовностей ДНК, присутніх в ПЛР-продуктах генів 16S рРНК. Ампліфікат ДНК, зазвичай розщеплюється ендонуклеазами рестрикції (наприклад, *AluI* і *HaeIII*), отримані фрагменти розділяються на вагарозному або поліакриламідному гелі. Якщо два організми різняться за відстанню між сайтами рестрикції, то фрагментація певною рестрикційною ендонуклеазою буде проявлятися у розмірі отриманих фрагментів. Для оцінювання розміру фрагмента використовують стандартні маркери молекулярних мас [22].

RFLP-метод найбільше підходить для досліджень на внутрішньовидовому рівні або порівняльного аналізу між тісно пов'язаними таксонами. Цей метод також є корисним для швидкого моніторингу динаміки структури мікробних угруповань з плином часу або для порівняння мікробного різноманіття в ґрунті за зміни умов навколишнього середовища [11].

Одним з основних обмежень RFLP є те, що отримані з мікробних угруповань профілі занадто складні для розділення гель-електрофорезом, оскільки один вид може мати від 4 до 6 рестрикційних фрагментів [18].

Поліморфізм довжини термінально мічених рестрикційних фрагментів (T-RFLP). Метод практично є аналогічним RFLP, за винятком однієї суттєвої відмінності, що полягає у використанні флуоресцентно-міченого праймера під час реакції ПЛР. Це дає змогу виявляти тільки термінально-позначені рестрикційні фрагменти (T-RFs), які розділяють на автоматизованому ДНК-секвенаторі [23]. Своєю чергою, це зменшує кількість бендів у зразках і спрощує картину діапазонів, що дозволяє проводити аналіз складних мікробних угруповань ґрунту, а також надавати інформацію про мікробне різноманіття, оскільки кожний T-RF є єдиною оперативною таксономічною одиницею (OTU). Біорізноманіття оцінюється шляхом аналізу розміру, кількості і висоти отриманих піків флуоресценції [24].

Дослідження показали, що метод «дуже чутливий і швидкий» для ідентифікації широкого спектра видів бактерій [11]. Велика база даних послідовностей гена 16S рРНК робить його ідеальним кандидатом для цих цілей. З урахуванням останніх досягнень в області біоінформатики розроблено комп'ютерні програми аналізу T-RFLP, що дозволяють дослідникам проводити швидку ідентифікацію OTU на основі баз даних фрагментів генів 16S рРНК, 18S рРНК та ITS-послідовностей [2].

Метод T-RFLP застосовувався для аналізу філотипової структури прокариотного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства. За результатами досліджень показано філогенетичну структуру прокариотного комплексу за інтенсивної, екологічної та біологічної систем землеробства та виявлено відповідно 101, 394, 459 ймовірних таксономічних кандидатур, що належали до філ *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*. Частка таксономічних одиниць, що не культивуються на поживних середовищах становила до 58 % [25].

Один важливий недолік методу T-RFLP полягає в тому, що він може недооцінювати різноманіття мікробного угруповання оскільки кількість смуг, що можуть бути розділені на гелі обмежена (зазвичай <100), і різні бактеріальні піки можуть мати однакову довжину T-RF (відбувається перекриття або гомоплазія OTU) [2]. Проте, цей метод забезпечує надійний індекс різноманіття мікробних угруповань ґрунту, результати T-RFLP, як правило, дуже добре корелюють з результатами з бібліотек клонів [18].

2.2. Скринінг бібліотек клонів

Серед методів, які вимагають ампліфікації специфічних послідовностей ДНК, широко використовується метод формування бібліотек клонів генів 16S рРНК на основі *Escherichia coli* з подальшим секвенуванням окремих фрагментів гена. Отримані послідовності порівнюються з відомими в базах даних, таких як GenBank, RDP та Greengenes. Зазвичай клоновані послідовності відносять до типу, класу, порядку, родини,

роду чи виду за значеннями критерію подібності послідовностей – 80, 85, 90, 92, 94 або 97%, відповідно [2, 11].

При аналізі ДНК бібліотеки потрібна робота з кожним з відібраних клонів. Скринінг бібліотеки генів 16S рРНК є коштовним і трудомістким процесом. Стандартна процедура скринінгу складається з вивчення ряду клонів з використанням методів молекулярної біології, наприклад, DGGE/TTGE. Хоча бібліотеки клонів генів 16S рРНК дозволяють провести початкову характеристику різноманіття та ідентифікувати нові таксони, дослідження показали, що для ґрунтових зразків може знадобитися більше 40 000 клонів для документування 50 % мікробного ценозу [18, 19]. Однак типові бібліотеки клонів генів 16S рРНК містять менше 1000 послідовностей і тому вдається оцінити лише невелику частину мікробного різноманіття, присутнього в зразку.

Незважаючи на трудомісткий та вартісний фактор, метод бібліотек клонів, як і раніше, вважають «золотим стандартом» для попередніх обстежень мікробного різноманітності. З появою нових і недорогих технік секвенування в цьому методі аналізу мікробного біому ґрунтів очікується значний прогрес [2].

2.3. Мікрочіпи ДНК (DNA microarrays)

Мікроматриці ДНК використовують, в основному, для забезпечення високопродуктивного і всебічного аналізу мікробних угруповань у зразках із навколишнього середовища. Продукти ПЛР, ампліфіковані із загальної ДНК, безпосередньо гібридизують з відомими молекулярними зондами, які прикріплюються на мікрочіпах. Після того, як флуоресцентно-мічені ПЛР-амплікони гібридизуються із зондами, позитивні сигнали оцінюють за допомогою конфокальної скануючої мікроскопії. В цілому інтенсивність сигналів гібридизації на мікрочіпах прямо пропорційна кількості цільового організму [26].

Перехресна гібридизація є основним обмеженням технології мікрочіпів, особливо при роботі зі зразками навколишнього середовища. Крім того, мікроареї не придатні для ідентифікації та виявлення нових прокариотних таксонів. Певні роди можуть бути повністю проігноровані якщо на мікрочіпі немає відповідного зонда. Мікроматриці ДНК, що використовуються в екології мікрорганізмів, можна розділити на дві основні категорії залежно від зондів: мікрочіпи генів 16S рРНК (PhyloChips) і функціональні генні масиви (FGA) [2].

Універсальний мікрочіп 16S з високою щільністю містить близько 30000 зондів гена 16S рРНК, націлених на декілька культивованих мікробних видів і «кандидатів філогенетичних груп». Ці зонди призначені для всіх 121 розмежованих порядків прокариот і дозволяють одночасно виявляти 8741 бактеріальних і архейних таксонів [26].

На відміну від PhyloChips, що призначені для виявлення якісного складу мікробного угруповання і як зонди містять гени 16S рРНК, FGA призначені в першу чергу для виявлення специфічних груп бактерій за метаболізмом. Таким чином, FGA не тільки розкриває структуру угруповання, але й дає уявлення про метаболічний потенціал мікробного ценозу *in situ*. FGA містять зонди для генів з відомими функціями. Наприклад, функціональний генний масив GeoChip, містить більше 24 000 зондів від усіх відомих метаболічних генів, залучених у різні біогеохімічні, екологічні процеси та такі як окиснення аміаку, окиснення метану і фіксація азоту та ін. [27].

2.4. Методи повногеномного секвенування

Вивчення мікробних біомів ґрунту за допомогою аналізу всього геному є комплексним підходом до розуміння екології і функцій мікроорганізмів. Повногеномне секвенування включає екстракцію ДНК з чистих культур; випадкову фрагментацію отриманої геномної ДНК на невеликі фрагменти ~ 2 т.п.н., лігування і клонування фрагментів ДНК у плазмідному векторі; двонаправлене секвенування фрагментів ДНК. Отримані нуклеотидні послідовності опрацьовують шляхом фільтрації, вирівнювання, відбору та класифікації за допомогою спеціалізованих комп'ютерних програм (MEGAN, QIIME та ін.) [2, 4]. Послідовності анують у відкритих рамах зчитування (ORF) для прогнозування закодованих білків (функцій). Повногеномне секвенування забезпечило безпрецедентне розуміння мікробіологічних процесів на молекулярному рівні і має потенційне широке застосування в біотехнології, індивідуальній та загальній екології,

ґрунтовій мікробіології, біоремедіації, біоенергетиці [11].

Сучасні розробки методів зчитування коротких послідовностей, таких як піросеквенування, значно скоротили час і витрати, необхідні для проектів повногеномного секвенування мікробних біомів. Величезний обсяг даних, зібраних з програм секвенування геномів, доступний для еволюційних досліджень, порівняльної геноміки та протеоміки у пошукових базах даних IMG, NCBI, GOLD. Наприклад, NCBI є публічною базою даних для проектів секвенування і містить понад 1000 повних геномів прокариот [10, 28].

Розвиток методів секвенування нового покоління, в тому числі технології піросеквенування, істотно розширили можливості масштабного вивчення біорізноманіття складних багатокомпонентних екосистем, особливо ґрунту та лягли в основу нової області в мікробіології – *метагеноміки* (дослідження сукупних мікробних геномів, отриманих безпосередньо із зразків навколишнього середовища) [11, 29].

Метагеномні методи засновані на концепції, що весь генетичний склад мікробного біому (*метагеном*) може бути секвенований і проаналізований таким же чином, як і сиквенсигеномів окремих чистих бактеріальних культур. Піросеквенування є найбільш сучасним та потужним методом, що дозволяє вивчення мікробного метагеному ґрунту [1].

Платформи секвенування нового покоління *Roche/454*, *Illumina/Solexa*, *Life/APG*, *HeliScope/HelicosBioSciences*, набагато швидші та дешевші, ніж традиційне секвенування клонуваних ампліконів за методом *Sanger*. Компанія *454Life Sciences* розробила метод піросеквенування, що дозволяє проводити масове паралельне високопродуктивне зчитування гіперваріабельних ділянок генів 16S рПНК. Ці фрагменти досить короткі (100-350 основ), але забезпечують достатню філогенетичну інформативність, що дозволяє виявляти реальне таксономічне різноманіття компонентів ґрунтового мікробіому, незалежно від функціональної спрямованості, трофізму та культивування на поживних середовищах [3,4].

Одна з переваг використання техніки піросеквенування полягає в одночасному аналізуванні декількох зразків ґрунту за один прохід шляхом присвоєння зразкам нуклеотидних «штрих-кодів» (додавання олігонуклеотидних ідентифікаторів (MID) під час ПЛР). В останньому випуску платформи третього покоління *454 GenomeSequencer XLR (GS FLX Titanium)* можна отримати близько 400 мільйонів високоякісних сиквенсів розміром ≥ 450 п.н. протягом 10-годинного піросеквенування з точністю 99,96 % [28].

За допомогою методу піросеквенування авторами проведено аналіз структури метагеному та таксономічного складу прокариотного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства. Кількість прочитаних послідовностей у пробах варіювала від 2941 до 3792 залежно від варіантів досліду із середньою довжиною 252 п.н. В загальному було отримано 1708 OTU. Атрибутування метагеномних нуклеотидних послідовностей на відповідність таксономічним одиницям дало можливість ідентифікувати 335 таксонів, з яких 6 належали до домену *Archaea*, 329 – до домену *Bacteria*. При цьому 67 % таксонів були ідентифіковані на рівні родини й 33 % – на рівні роду. Кількість некласифікованих бактерій становила 18 % (296 OTU) [29].

2.5. Недоліки та обмеження методів молекулярно-біологічного аналізу

Молекулярно-біологічні методи, так само як і методи культивування, мають свої недоліки та упередження на певних етапах [5]. Після екстрагування «тотальної» ДНК з ґрунтових зразків можливим є неповний лізис певних мікробних клітин, що призводить до спотворення структури та різноманіття мікробного угруповання за його оцінки [2, 11].

Обмеження при проведенні ПЛР пов'язані з пригніченням реакції гуміновими кислотами, які, як правило, екстрагуються з ґрунту разом із ДНК. Колективом авторів адаптовано та відпрацьовано методику екстракції «тотальної» ДНК ґрунтових організмів з різних типів ґрунтів на основі СТАВ-буфера та методику очищення екстракту від гумінових кислот за допомогою сорбції на оксид кремнію. Дана методика дозволяє отримати високоочищені препарати тотальної ДНК ґрунтових організмів чорнозему розміром ≥ 10 тис. п.н. в концентрації необхідній для подальшої ампліфікації гену 16S рПНК [1, 3, 4].

Гібридизація та специфічність праймерів іноді викликають переважаючу ампліфікацію окремих матриць ДНК, що впливає на кількісну оцінку мікробного різноманіття. Виникнення ПЛР артефактів (химерні молекули, делеції та точкові мутації) також можуть призводити до помилкових результатів [2, 11].

3. Заключення

Таким чином, для розуміння біогеохімічних процесів ґрунтоутворення та розкриття механізмів взаємодії в системі ґрунт – мікроорганізми – рослина основним завданням мікробіології є об'єктивна, комплексна оцінка якісного складу та функціональної спрямованості мікробних ценозів, що формуються під впливом різних агрозаходів.

На сьогодні ґрунтова мікробіологія отримала доступ до комплексного вивчення мікробіоти у всій повноті завдяки потужному розвитку молекулярно-біологічних методів аналізу, що дозволяють виявляти реальне таксономічне різноманіття компонентів ґрунтового мікробного біому, незалежно від можливості їх культивування на поживних середовищах. У результаті застосування для оцінки генетичних ресурсів мікроорганізмів сучасних методів виділення тотальної ДНК, скринінгу бібліотек клонуваних генів, генетичного фінгерпринтингу, повногеномного секвенування можливо отримати унікальні дані щодо складу, структури і, відповідно, функцій мікробних угруповань ґрунту. Створення сучасних платформ піросеквенування та стрімкий розвиток біоінформатики обумовили формування нового напрямку в дослідженні мікробних систем – метагеноміки.

У той же час усі молекулярні підходи, що доступні для оцінки структури та функціонального різноманіття мікробних угруповань мають свої таксономічні і методологічні переваги та обмеження. Оскільки досі немає точного уявлення про видове різноманіття мікроорганізмів, тому не можна вибрати метод для його визначення, який був би найкращим і забезпечував повний доступ до генетичного і функціонального різноманіття складних мікробних угруповань ґрунту. Для комплексної оцінки слід застосовувати поєднання декількох методів. Вкрай важливим є розвиток інструментів біоінформатики, необхідних для оцінки величезної кількості інформації, що генерується на основі повногеномного, метагеномного і метатранскриптомного підходів.

Для України залишається актуальним і важливим створення бази даних метагеномного різноманіття та таксономічного складу прокариот різних типів ґрунту за різних систем землеробства з метою біокартування та пошуку індикаторних видів у розробці методів біоіндикації щодо впливу агротехнічних заходів на стан ґрунту та показники його родючості.

Список використаної літератури

1. Patyka N.V., Kolodjashnyi A.Yu., Borko Yu.P. Evaluation of metagenome and detection of the functionally significant polymorphisms of prokaryotes of soil with using the method of pyrosequencing. "Microbial Biodiversity: current problems and solutions", Materials of Intern. Scientific-practical. Conf. Astana, 2016. P. 96-101.
2. Rastogi G., Sani R.K. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer New York, 2011. P. 29-57.
3. Колодяжний О.Ю., Андронов Є.Є., Патица М.В. Молекулярно-біологічне оцінювання прокариотного комплексу чорнозему типового за вирощування пшениці озимої. Збірник наукових праць ННЦ «Інститут землеробства НААН». 2014. № 1-2. С. 61–67.
4. Патыка Н.В., Колодяжний А.Ю., Ибатуллин И.И. Оценка метагенома и детекция функционально значимых полиморфизмов прокариот почвы с использованием метода пиросеквенирования. *Микробиологический журнал*. 2016. Т. 78, № 2. С. 43–51.
5. Zhou J., Xia B., Huang H. Microbial Diversity and Heterogeneity in Sandy Subsurface Soils. *Applied and environmental microbiology*. 2004. Vol. 70, No 3. P. 1723–1734.
6. Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник в 3 т. СПб.: Изд-во, С.-Петербург. Ун-та, 2006. Т. 1. 356 с.
7. Sharpton T.J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front. PlantSci*. 2014 5:209. doi: 10.3389/fpls.2014.00209.
8. Uroz S., Buee M., Murat C. [et al.]. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ Microbiol*. 2010. №. 2. P. 281–288.
9. Першина Е., Тамазян Г., Дольник А. [и др.] Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Экологическая генетика*. 2012. Т 10, №2. С. 31–38.
10. Green Tringe S., Rubin M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature reviews: Genetics*. Nature Publishing Group. 2005. Vol. 6. P. 805–814.
11. Гадзало Я.М., Патыка Н.В., Заришняк А.С. Агробиология ризосферы растений: монография К.: Аграрна наука, 2015. 386 с.
22. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev*. 1995. 59. P.143–169.

13. Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99. P. 10494–10499.
14. Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* 2002. V. 3. Reviews0003.
15. Ghebremedhin B., Layer F., König W., König B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16 rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. P.1019–1025.
16. Muyzer G., Waal E.C.D., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. 59. P. 695–700.
17. Busse H, Denner E.B.M., Lubitz W.J. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* 1996. 47. P. 3–38.
18. Чабанюк Я.В. Молекулярні методи вивчення різноманіття ґрунтових мікроорганізмів. *Агроекологічний журнал*. 2013. № 3. С. 107–114.
19. Mühling M., Woolven-Allen J., Murrell J.C., Joint I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2008. V. 2. P. 379–392.
20. Franklin R.B., Taylor D.R., Mills A.L. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Microbiol. Methods.* 1999. 35. P. 225–235.
21. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker/ Y. Yang, J. Yao, S. Hu, Y. Qi. *Microb. Ecol.* 2000. 39. P. 72–79.
22. Smit E., Leeflang P., Wernars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1997. 23. P. 249–261.
23. Michel Jr., Marsh T.L., Reddy C.A. Characterization of microbial community structure during composting using analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Microbiol. Composting*. Heidelberg: Springer, 2002. P. 25–42.
24. Профіль поліморфізму длин рестрикційних фрагментів (tRFLP) комплексу прокариотних мікроорганізмів подзолистої ґрунту / Н.В. Пати́ка, Ю.В. Круглов, І.А. Тихонович, В.Ф. Пати́ка. *Доп. НАН України*. 2009. № 1. С. 187–192.
25. Формування біорізноманіття та філотипової структури еубактеріального комплексу чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої / М.В. Пати́ка, С.П. Танчик, О.Ю. Колодяжний [та ін.]. *Доповіді НАН України*. 2012. № 11. С. 163–171.
26. Microarray applications in microbial ecology research/ T.J. Gentry, G.S. Wickham, C.W. Schadt [et al.]. *Microb. Ecol.* 2006. 52. P. 159–175.
27. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes/ Z. He, T.J. Gentry, C.W. Schadt [et al.]. *ISME J.* 2007. 1. P.67–77.
28. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 2010. 11. 31–46.
- 29 Evaluation of Metagenomes and Detection of Functionally Significant Polymorphisms of Soil Prokaryotes Using the Pyrosequencing Method/ N.V. Patyka, A.Yu. Kolodyazhnyi, N.A. Bublyk, T.I. Patyka. *J. of Nat. Sc. and Sust. Tec.* 2017. Volume 11, Issue 1.

UDC 576.26:577.2.08:579.64:631.46

Modern molecular methods to study the microbial biome and metagenome of agrarian soils

M.V. Patyka¹, A.Yu. Kolodyazhnyi^{1*}, Yu.P. Borko²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²National Scientific Center "Institute of Agriculture NAAS", Chabany, Kiev region, Ukraine

E-mail: O.kolodjzhny@i.ua

Assess the species structure of mixed cultures and associations of microorganisms without separating them in pure culture in such complex environments, like water and soil made possible by the development of powerful molecular-biology techniques. Over the past decades was developed a series of approaches based on direct extraction and analysis of nucleic acids from samples of soil. So, aim of the work was characterization modern molecular-biological methods and approaches which application opens a new understanding of the phylogenetic and functional diversity of microbial communities of agrarian soils. Molecular approaches such as genetic fingerprinting, screening of clone libraries, DNA microarrays, metagenomics are extremely important for objective, complex evaluation of the qualitative composition and structure of soil microbial communities that are influenced by different farming practices. In manuscript have been briefly described latest advances in molecular microbial ecology with a focus on new methods and approaches to identify the real taxonomic diversity of component of soil microbial biome and new functional genes of microorganisms. This will help in understanding the biogeochemical processes of soil formation and uncovering the mechanisms of interaction in the system soil - microorganisms - plant.

Keywords: microorganisms; microbial biome; metagenome; DNA; soil; biodiversity; molecular-biological methods.