

© Е. В. Першина¹, Г. С. Тамазян²,
А. С. Дольник², А. Г. Пинаев¹,
Н. Х. Сергалиев³, Е. Е. Андронов¹

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии; ² Санкт-Петербургский государственный университет, математико-механический факультет, кафедра информатики и кафедра статистического моделирования; ³ Западно-Казахстанский аграрно-технический университет им. Жангир хана

✿ С использованием метода пиросеквенирования (454 Roche) исследована таксономическая структура почвенного микробного сообщества в 6 пробах, отобранных из солончака вдоль градиента засоленности и в двух пробах незасоленных почв. В результате анализа выявлены три основные экологические группы микроорганизмов, закономерно сменяющие друг друга в зависимости от степени засоленности почвы. Галофильные микроорганизмы представлены в основном бактериями — представителями трех фил: *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, и в меньшей степени археями (сем. *Halobacteriaceae*). На расстоянии 150–200 м от наиболее засоленной точки микробное сообщество проявляет значительное сходство с контрольными образцами незасоленной почвы.

✿ **Ключевые слова:** микробное сообщество; почвенное засоление; пиросеквенирование.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Экосистемы, подверженные как естественному, так и искусственному засолению широко распространены по всему миру и включают в себя такие местообитания, как содовые и соленые озера, лиманы, гипергалинные горячие источники, солончаки, солонцы и другие типы почв с различной степенью засоленности (Oren., 2002). Водные засоленные местообитания изучены достаточно полно (Benlloch et al., 2002, Bodaker et al., 2010, Crump et al., 2004, Mesbah et al., 2007), чего нельзя сказать о почвенных сообществах, которым посвящено сравнительно небольшое число исследований (Caton et al., 2004, Ventosa et al., 2008, Walsh et al., 2005). Почвенное засоление, обусловленное главным образом применением несовершенных методов орошения и увеличением числа территорий с аридным климатом, является одной из актуальных проблем современного земледелия. Так, по данным ЮНЕСКО, более 50% орошаемых земель подвергаются так называемому вторичному засолению (Rietz et al., 2003) и выводятся из сельскохозяйственного оборота.

Настоящее исследование направлено на изучение микробного сообщества в почвах, подверженных естественному засолению в условиях аридного климата на территории республики Казахстан. Эта работа является продолжением ранее опубликованного исследования по изучению структуры микробного сообщества вдоль градиента засоленности на участках солончака в окрестностях озера Акколь (Андронов и др., 2012), где было показано, что засоленность является основным экологическим фактором, определяющим структуру микробного сообщества в исследованных почвах. В исследовании был использован метод T-RFLP, который не позволяет проводить детальную таксономическую идентификацию, которая нужна для определения структуры микробного сообщества и выявления микроорганизмов-индикаторов засоления.

Еще недавно определение таксономического состава микробного сообщества представляло собой трудную задачу, требующую больших материальных и временных затрат, связанных с процедурами клонирования и последующего секвенирования нуклеотидных последовательностей, что ограничивало не только число выявляемых видов микроорганизмов, но и диапазон исследуемых местообитаний (Wooley et al., 2010). Ситуация существенно изменилась с внедрением в молекулярную экологию методов секвенирования нового поколения, в том числе технологии пиросеквенирования (Mardis et al., 2008, Ronaghi, 2004). Применение этих методов существенно расширило возможности масштабного изучения сложных многокомпонентных экосистем, включая почвенные микробные сообщества. При исследовании микроорганизмов в засоленных почвах, ассоциированных с гипергалинным озером Ла-Сал-Дель-Рей (Техас, США), анализировали библиотеки по гену 16S рРНК, как с помощью стандартных процедур секвенирования по Сэнджеру, так и методом пиросеквенирования (Hollister et al., 2010). Оказалось, что метод пиросеквенирования позволяет выявить не только основные, но и минорные филы, такие как *Deinococcus-Thermus*, *TM7*, *OP10*, *OP11*, *Thermotogae* и др., известные благодаря их единичным представителям (Janssen, 2006).

Поступила в редакцию 12.03.2012
Принята к публикации 05.04.2012

Поэтому именно метод пиросеквенирования использован в настоящем исследовании, целью которого является изучение таксономической структуры микробного сообщества в почвах с различной степенью засоленности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Отбор почвенных образцов. Отбор почвенных образцов проводили летом 2009 года в окрестностях оз. Акколь, района Шингирлау (Казахстан). В районе солончака вдоль градиента засоленности было отобрано 5 проб почвы (T1—51°4'14.45"С, 54°2'52.00"В; T2—51°4'14.46"С, 54°2'51.19"В; T2_3—51°4'14.11"С, 54°2'51.23"В; T3—51°4'14.08"С, 54°2'49.66"В; T4—1°4'13.67"С, 54°2'48.47"В; T5—51°4'8.45"С, 54°2'36.52"В). В качестве контрольных брали образцы из незасоленных темно-каштановых почв сельскохозяйственного назначения, расположенных в 195 км от солончака: 15-летняя залежь (NZ, 51°10'40.17"С, 51°13'31.14"В) и целина (NC, 51°9'24.98"С, 51°16'57.11"В). Во всех случаях пробы отбирали из горизонта А1 на глубине 10 см. Для всех проб были определены основные физико-химические показатели (Андронов и др., 2012), из которых для определения степени засоленности были использованы электропроводность и суммарное содержание солей в образце (табл. 1).

2. Выделение ДНК. ДНК выделяли из 0,5 г почвы по методике, подробно описанной в предшествующей публикации (Андронов и др., 2009).

3. Секвенирование нуклеотидных последовательностей.

4. Очищенный препарат ДНК использовался в качестве матрицы в реакции ПЦР с универсальными праймерами к варибельному участку V4 гена 16S рРНК F515 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806 GGAC-

TACVSGGGTATCTAAT (Bates et al., 2010) с добавлением олигонуклеотидных идентификаторов для каждой пробы (20 штук) и служебных последовательностей, необходимых для пиросеквенирования по протоколу Roche. Используемые праймеры были сконструированы на основе анализа последовательностей как бактерий, так и архей. Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior (Roche, USA) согласно рекомендациям производителя. Все последовательности были депонированы на сервере NCBI Short Reading Archive (SRA) (<http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) с присвоением идентификатора SRA049908.2.

5. Анализ нуклеотидных последовательностей. 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 (Cole et al., 2008). С использованием программы MOTHUR версии 1.22.2 (Schloss et al., 2009) проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей, построение матрицы генетических расстояний и кластерный анализ последовательностей с применением алгоритма average neighbor. 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) (Colwell, 2009).

6. Определение таксономической структуры микробных сообществ и их сравнительный анализ. Таксономическую идентификацию нуклеотидных последователь-

Таблица 1

Некоторые физико-химические, технологические и экологические параметры исследованных почвенных образцов

Образец	Электропроводность, μS	Суммарное содержание солей, %	Количество секвенированных последовательностей	Количество OTU*	Индекс Шеннона	Индекс ChaoI	Идентификатор SRA**
T1	>2500	1,234	1566	626	5,52	1757,07	SRS291229.4
T2	1880	1,192	1107	419	5,23	1165,20	SRS291230.4
T2_3	665	0,225	2079	478	4,53	1186,90	SRS291231.4
T3	335	0,057	1517	561	5,34	1652,75	SRS291232.2
T4	40	0,029	1687	562	5,10	1631,83	SRS291233.3
T5	9	0,014	1102	374	4,76	1054,71	SRS291234.2
NZ	Не опр.	0,036	1178	631	5,58	1866,00	SRS291235.3
NC	Не опр.	0,049	1480	590	5,70	1931,77	SRS291236.2

* — Operational Taxonomic Unit; ** — Short Reading Archive.

ностей 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). При использовании сайта VAMPS были получены таблицы, содержащие значение доли идентифицированных микроорганизмов в каждой пробе. Эти таблицы были использованы в дальнейшем для регрессионного анализа, проведенного для выявления таксонов, демонстрирующих тенденцию к увеличению / уменьшению численности с ростом засоленности. Модель представляла собой линейное уравнение вида

$$y = a \cdot x + b,$$

где y — доля того или иного таксона, x — засоленность почвы (значение электропроводности). Все выявленные таксоны были ранжированы по коэффициенту «а» и разделены на две группы: численность которых растет с увеличением засоленности ($a > 0$) или, наоборот, падает ($a < 0$). В приложении VAMPS нами был проведен также кластерный анализ последовательностей из всех проб с использованием алгоритма UPGMA и индекса Morisita-Horn и построена дендрограмма родства микробных сообществ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате секвенирования было получено 22 629 нуклеотидных последовательностей, из которых для дальнейшего анализа после прохождения теста на качество было отобрано 11 716 со средней длиной $258,22 \pm 0,02$ п. н. Количество последовательностей в пробах варьировало от 1102 для участка T5 до 2079 для T2_3. При этом индексы разнообразия Шеннона для этих участков оказались сходными и имели по сравнению с остальными участками достаточно низкие значения. Участок T5 характеризовался также и минимальными значениями OTU — 374; максимальных значений количество OTU достигало в пробе NZ — 631 (табл. 1). Индексы ChaoI для всех проб имели сходные значения по отношению к выявленному разнообразию (количеству OTU) и превышали его в среднем в три раза (табл. 1). При таксономическом анализе нуклеотидных последовательностей во всех пробах были выявлены представители 17 бактериальных фил: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, TM7 и *Verrucomicrobia*. Археи представлены филей *Euryarchaeota*. Помимо бактерий и архей с установленным систематическим положением, все пробы содержали большое коли-

чество неатрибутируемых (НА) последовательностей бактерий, доля которых варьировала от 13 до 37%. Для архей это значение было значительно ниже — от 0,08 до 0,1% (рис. 1). При сравнительном анализе образцов из различных почвенных участков были выявлены четкие тенденции к изменению таксономического состава в зависимости от степени засоленности почвы (рис. 2). С увеличением засоленности возрастала относительная доля *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, представленных, в частности, галофильными бактериями из семейств *Rhodospirillaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, а также *Halomonadaceae* (*Proteobacteria*), *Rhodothermaceae* (*Bacteroidetes*) и *Bacillaceae*, *Halobacillus* (*Firmicutes*). Из галофильных архей были выявлены представители одного единственного семейства *Halobacteriaceae*. Все вышеперечисленные галофильные микроорганизмы, встречающиеся обычно в местообитаниях с крайне высоким содержанием солей (до 250 г/л), были обнаружены нами исключительно на участках T1 и T2. По мере удаления от зон с повышенным содержанием солей (участки T2_3 и T3) в составе микробного сообщества появляются группы умеренных галофилов и галотолерантных бактерий из родов *Haliangium*, *Marinobacter*, *Microbulbifer*, *Prosthecomicrobium*, *Maribius*, *Marinimicrobium*, *Salinisphaera* (*Proteobacteria*), *Oceanobacillus*, *Shimazuella* (*Firmicutes*), *Gillisia*, *Marinosculum* (*Bacteroidetes*), *Blastopirellula*, *Rhodopirellula* (*Planctomycetes*), *Nitrospira* (*Nitrospira*), *Myceligenans* и *Terrabacter* (*Actinobacteria*) а также таких семейств, как *Saprospiraceae* (*Bacteroidetes*) и *Puniceicoccaceae* (*Verrucomicrobia*). Из приведенных данных видно, что таксономическое разнообразие на менее засоленных участках несколько выше, чем на участках T1 и T2. При дальнейшем движении вдоль трансекты (точки T4 и T5) идет переход от солончака лугового к каштановой почве с появлением степной растительности, что вызывает закономерную смену в составе микробного сообщества, в котором начинают доминировать типичные почвенные представители филы *Actinobacteria*, также заметно увеличивается численность бактерий из фил *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria* (рис. 1). Сходную таксономическую структуру имеет также и микробное сообщество на участке NZ. В пробе NZ по сравнению со всеми предыдущими участками, кроме T1, отмечается значительное увеличение доли *Firmicutes* в сообществе, а также максимальное содержание актинобактерий.

Все обнаруженные тенденции в изменении состава микробного сообщества подтверждает и проведенный нами кластерный анализ (рис. 3). На рисунке 3 можно выделить два крупных кластера, один из которых объединяет участки с повышенной засоленностью, а другой участки T4 и T5 с контрольными пробами NZ и

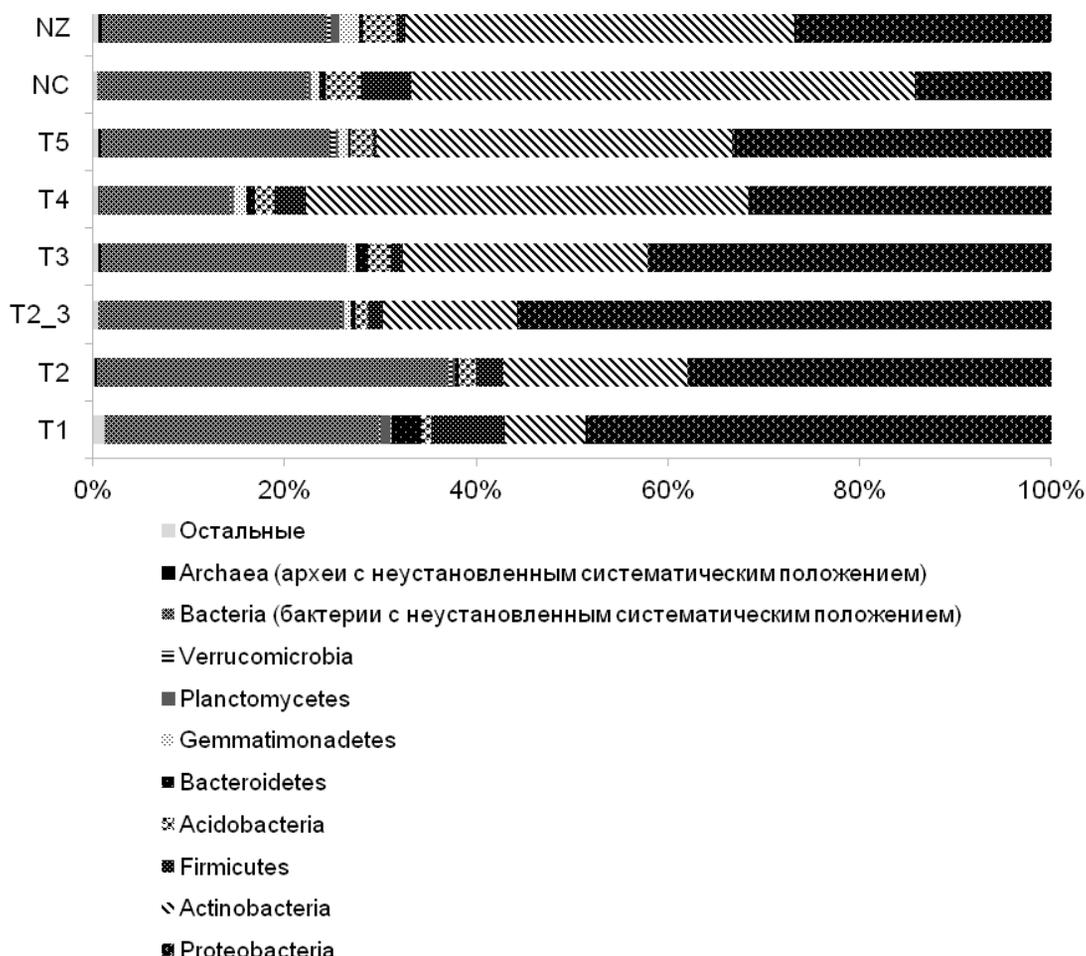


Рис. 1. Процентное содержание бактериальных и археотных фил в почвенных образцах

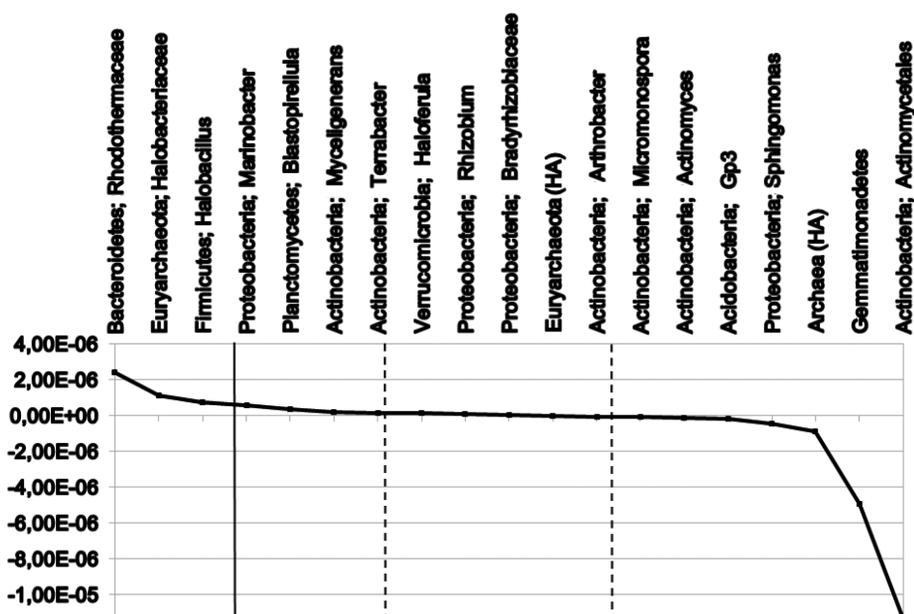


Рис. 2. Распределение экологических групп микроорганизмов по их отношению к засоленности (в качестве меры засоленности по оси ординат отложены значения коэффициента a , полученные из линейного уравнения $y = a \cdot x + b$, где y — доля представленности того или иного таксона, x — засоленность почвы)

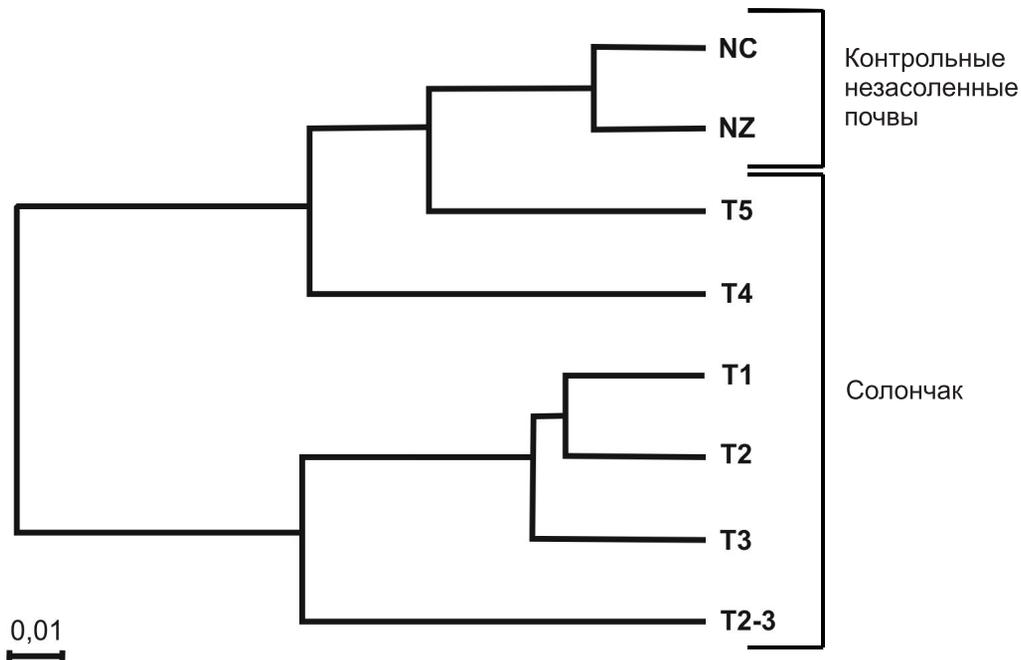


Рис. 3. Кластерный анализ сходства микробных сообществ в различных образцах засоленной и незасоленной почвы

NC. Первый кластер, в свою очередь, разделяется на два второстепенных, которые полностью соответствуют описанным выше сообществам галофильных (участки T1 и T2) и умеренно галофильных (T2_3 и T3) микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы с использованием метода пиросеквенирования мы проанализировали свыше 10 000 последовательностей, что почти на порядок превышает показатели при использовании секвенирования по Сэнджеру. Тем не менее значения индекса Chao1 свидетельствуют о том, что даже такого внушительного количества экспериментального материала недостаточно для полного описания имеющегося уровня микробного биоразнообразия. Вопреки распространенному мнению о том, что экстремальные местообитания характеризуются низкими уровнями биоразнообразия (Fiebig, 2008), мы получили высокие показатели индекса Шеннона, которые подтверждаются анализом таксономической структуры исследуемых сообществ.

Несмотря на очевидные достоинства технологии пиросеквенирования, необходимо отметить, что этот метод не лишен так называемого bias-эффекта (или эффекта предпочтения), который может выражаться в деформации описания природного разнообразия, обусловленной особенностями методического подхода (Acinas et al., 2005; Morales et al., 2009). Помимо таких широко рас-

пространенных источников bias-эффекта, как процедура выделения ДНК и избирательная амплификация, при использовании технологии пиросеквенирования возникает еще одна проблема — снижение разрешающей способности метода при прочтении гомополимерных повторов в нуклеотидной последовательности. Наличие таких повторов может быть причиной завышенных или, наоборот, заниженных оценок биоразнообразия, в зависимости от параметров проверки качества последовательностей (Mardis et al., 2008).

Несмотря на сравнительно небольшую длину включенных в исследование нуклеотидных последовательностей, в большинстве случаев нами была проведена их успешная идентификация на уровне семейства и рода. Это позволило выявить две обособленные группы микроорганизмов-индикаторов почвенного засоления — это галофильные бактерии и археи и умеренно галофильные и галотолерантные бактерии. В первой группе, в отличие от традиционных представлений о повышенном содержании архей в экстремальных местообитаниях, доминировали бактерии, большинство из которых принадлежало трем филам — *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Этот результат хорошо согласуется с данными о микробных сообществах на засоленных участках, где также доминируют представители вышеупомянутых фил и отмечено низкое содержание архей с преобладанием семейства *Halobacteriaceae* (Hollister et al., 2010). Совпадение результатов исследований проведенных на различных солончаках говорит в пользу того, что совместное присутствие определенных

групп бактерий является характерным признаком этого местообитания и может быть использовано в качестве индикатора степени засоленности почв. Среди умеренно галофильных и галотолерантных микроорганизмов нами выявлены представители родов бактерий, ранее описываемых при изучении морских местообитаний, что указывает на широкий спектр экологических адаптаций.

Установленная в работе таксономическая структура микробных сообществ в засоленных участках меняет сложившееся мнение (Zvyagintsev et al., 2009) о доминировании в засоленных почвах представителей фило *Actinobacteria*. Результаты наших исследований указывают на то, что актинобактерии практически полностью отсутствуют в засоленных почвах. Значительное увеличение численности этой группы бактерий наблюдается лишь на границах солончака и в точках NC и NZ.

В предыдущей работе, пытаясь объяснить низкий порог кластеризации при анализе бактериальных T-RFLP профилей, мы предположили, что он может быть связан с однородной таксономической структурой сообщества (состоящего в основном из актинобактерий) и приспособительным характером эволюции в засоленных местообитаниях (Андронов и др., 2012). С включением в анализ высокопроизводительного метода пиросеквенирования оказалось, что низкий порог кластеризации был связан, скорее всего, с ограничениями выбранной методики (Андронов и др., 2012). Обратная ситуация сложилась в отношении архей. Здесь при использовании метода T-RFLP нами были выделены полностью обособленные кластеры, что повлекло за собой вывод о повышенных уровнях биоразнообразия в этой группе и даже о ее доминирующем положении в сообществе. Здесь сыграли роль сразу два фактора: во-первых, большая разрешающая способность метода T-RFLP при анализе малокомпонентных сообществ, а во-вторых, использование домен-специфичных праймеров для Archaea. Однако не стоит полностью полагаться и на данные пиросеквенирования, поскольку используемые в этом случае праймеры, как уже отмечалось ранее, являются источником bias-эффекта и могут иметь низкое сродство к нуклеотидным последовательностям архей.

Значимым дополнением к кластерному анализу является регрессионный анализ с ранжированием групп бактерий по тенденции изменения численности с ростом засоленности. Этот (впервые использованный в данной работе) анализ является важным дополнением к стандартным методикам оценки разнообразия сообществ (Лукашов, 2009, Kunin et al., 2008), так как позволяет упорядочить огромный массив информации и выявить микроорганизмы-индикаторы при различных уровнях почвенного засоления. Следует отметить удачный выбор параметра электропроводности для ранжирования микробного сообщества, так как именно содержание

свободных ионов (в противовес общему содержанию солей) является значимым экологическим фактором, непосредственно влияющим на функционирование прокариотной клетки. Используемые нами математические построения позволили выявить группы галофильных микроорганизмов и количественно определить их экологические предпочтения. Предложенная в нашей работе методика ранжирования микроорганизмов по отношению к определенным экологическим факторам может быть использована не только для поиска микроорганизмов-индикаторов засоления, но и для решения обратной задачи — выявления связей агроэкологического состояния почвы с таксономической структурой резидентных микробных сообществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление в микробиологической практике методов проточного секвенирования произвело революционный сдвиг в понимании истинных масштабов природного генетического разнообразия микробных сообществ. Использование современных технологий секвенирования открыло принципиально новые возможности в анализе сотен тысяч нуклеотидных последовательностей, что позволило перейти от описательной экологии микроорганизмов к функциональной метагеномике, которая рассматривает микробное сообщество как единую систему. В данной работе нами была предпринята попытка проведения подобного рода анализа на примере описания закономерной смены состава микробного сообщества в зависимости от значений засоленности.

Работа поддержана грантом Министерства науки и образования РФ (ГК № 16.552.11.7047), Программой поддержки фундаментальных исследований по приоритетным направлениям СПбГУ и Программой «Фундаментальные исследования в области естественных наук» комитета науки Министерства образования и науки республики Казахстан

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андронов Е.Е., Петрова С.Н., Пинаев А.Г. 2012. Изучение структуры микробного сообщества почв разной степени засоления с использованием T-RFLP и ПЦР с детекцией в реальном времени // Почвоведение. № 2. С. 173–183.
2. Андронов Е.Е., Петрова С.Н., Чижевская Е.П. и др. 2009. Влияние внесения генетически модифицированного штамма *Sinorhizobium meliloti* Ach_5 на структуру почвенного сообщества микроорганизмов // Микробиология. Т. 78. № 4. С. 525–534.
3. Лукашов В.В. 2009. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 256 с.

4. *Acinas S.G., Sarma-Rupavtarm R., Klepac-Ceraj V.* et al. 2005. PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 12. № 71. P. 8966–8969.
5. *Bates S. T. D., Berg-Lyons J. G., Caporaso W. A.* et al. 2010. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *ISME J.* № 5. P. 908–917.
6. *Benlloch S., López-López A., Casamayor E.* et al. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern // *Env. Microbiol.* V. 6. № 4. P. 349–360.
7. *Bodaker I., Sharon I., Suzuki M. T.* et al. 2010. Comparative community genomics in the Dead Sea, an increasingly extreme environment // *ISME J. V. 3.* № 4. P. 399–407.
8. *Caton T. M., Witte L. R., Ngyuen H. D.* et al. 2004. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the great salt plains of Oklahoma // *Microb. Ecol.* № 48. P. 449–462.
9. *Cole J. R., Wang Q., Cardenas E.* et al. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // *Nucleic Acids Res.* № 37. P. D141–D145.
10. *Colwell R. K.* 2009. Biodiversity: Concepts, Patterns and Measurement // *The Princeton guide to ecology* / Ed. Levin S. A. et al., Princeton.: Princeton University Press. P. 257–263.
11. *Crump B., Hopkinson Ch., Sogin M.* et al. 2004. Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient: Combined Influences of Bacterial Growth and Residence Time // *Appl. Env. Microbiol.* V. 70. № 3. P. 1494–1505.
12. *Fierer N.* 2008. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time // *Assessing Uncultivated Microorganisms: from the Environment to Organisms and Genomes and Back* / Ed. K. Zengler, Washington: ASM Press P. 95–115.
13. *Hollister E. B., Engledow A. S., Hammett A. J.* et al. 2010. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments // *ISME J.* № 4. P. 829–838.
14. *Janssen P. H.* 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes // *Appl. Environ Microbiol.* V. 72. P. 1719–1728.
15. *Kunin V., Copeland A., Lapidus A.* et al. 2008. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics // *Microbiology and molecular biology reviews.* V. 72. № 4. P. 557–578.
16. *Mardis E. R.* 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* V. 9. P. 211–219.
17. *Mesbah N. M., Abou-El-Ela S. H., Wiegel J.* 2007. Novel and Unexpected Prokaryotic Diversity in Water and Sediments of the Alkaline, Hypersaline Lakes of the Wadi An Natrun, Egypt // *Microbial ecology.* V. 54. P. 598–617.
18. *Morales S. E., Cosart T. F., Johnson J. V.* et al. 2009. Extensive Phylogenetic Analysis of a Soil Bacterial Community Illustrates Extreme Taxon Evenness and the Effects of Amplicon Length, Degree of Coverage, and DNA Fractionation on Classification and Ecological // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 75. № 3. P. 668–675.
19. *Oren A.* 2001. Halophilic Microorganisms and their environments. Boston: Kluwer Academic. 575 p.
20. *Rietz D. N., Haynes R. J.* 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity // *Soil Biology & Biochemistry.* № 35. P. 845–854.
21. *Ronaghi M.* 2004. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis // *Methods Mol. Biol.* V. 255. P. 211–219.
22. *Schloss P. D., Westcott S. L., Ryabin T.* et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 23. № 75. P. 7537–7541.
23. *Ventosa A., Mellado E., Sanchez-Porro C.* et al. 2008. Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils // *Microbiology of Extreme Soils/Eds. Dion P., Nautiyal C. S., Berlin: Springer-Verlag.* P. 87–115.
24. *Walsh D. A., Papke R. T., Doolittle W. F.* 2005. Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance // *Environ. Microbiol.* № 7. P. 1655–1666.
25. *Wooley J. C., Ye Y.* 2010. Metagenomics: Facts and artifacts, and computational challenges // *Journal of computer science and technology.* V. 1. № 25. P. 71–81.
26. *Zvyagintsev D. G., Zenova G. M., Oborotov G. V.* 2009. Moderately haloalkaliphilic actinomycetes in salt_affected soils // *Eurasian Soil Science.* V. 42. № 13. P. 1515–1520.

STUDYING THE STRUCTURE OF SOIL MICROBIAL COMMUNITY IN SALINE SOILS BY HIGH-THROUGHPUT PYROSEQUENCING

Pershina E. V., Tamazyan G. S., Dolnik A. S., Pinaev A. G., Sergaliev N. H., Andronov E. E.

✳ **SUMMARY:** The taxonomic structure of soil microbial community was studied in six samples taken from a salt marsh along the salinity gradient and in two samples of non-saline soils using pyrosequencing method (454 Roche). The analysis allowed to identify three main ecological groups of microorganisms depending

on the degree of the soil salinity. Halophilic microorganisms were mainly represented by bacteria of three phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* and included much less of archaea (the *Halobacteriaceae* family). Within the distance of 150–200 m from the point with the highest levels of salinity, the microbial community tends to have a considerable similarity with control samples of non-saline soils.

✿ **KEY WORDS:** microbial community; soil salinity; pyrosequencing.

✿ Информация об авторах

Андронов Евгений Евгеньевич — заведующий лабораторией, к. м. н., ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Лаб. № 5. Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, 3. E-mail: eeandr@gmail.com.

Дольник Александр Сергеевич — ассистент кафедры. Санкт-Петербургский государственный университет, математико-механический факультет, кафедра информатики. Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр., 28. E-mail: alexander.dolnik@gmail.com.

Першина Елизавета Владимировна — инженер I категории. ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Лаб. № 5. Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, 3. E-mail: Pershina.elizaveta@yandex.ru.

Пинаев Александр Георгиевич — м. н. с., ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Лаб. № 9. Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, 3. E-mail: a_pinaev@yahoo.com.

Сергалиев Н. Х. — Западно-Казахстанский аграрно-технический университет им. Жангир хана МОН РК. РК, Уральск, ул. Жангир хана, 51

Тамазян Гайк Симакович — аспирант I-го курса. Санкт-Петербургский Государственный университет, Математико-Механический факультет, кафедра статистического моделирования. tamazyangayk@gmail.com.

Andronov Evgeny — Head of the laboratory. Ph. D. All-Russia. Research Institute for Agricultural Microbiology, RAAS. Lab. № 5. Podbelsky chaussee 3, Pushkin-8, Saint-Petersburg. E-mail: eeandr@gmail.com.

Dolnik Alexander — assistant of the Department. Saint-Petersburg State University, Mathematics and Mechanics faculty. Department of computer Science. Universitetskiy av. 28, Staryi Peterhof, Saint-Petersburg, E-mail: alexander.dolnik@gmail.com.

Pershina Elizaveta — engineer of the first category. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, RAAS. Lab. № 5. Podbelsky chaussee 3, Pushkin-8, Saint-Petersburg. E-mail: Pershina.elizaveta@yandex.ru.

Pinaev Alexander — Researcher assistant. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, RAAS. Lab. № 9. Podbelsky chaussee 3, Pushkin-8, Saint-Petersburg. E-mail: a_pinaev@yahoo.com.

Sergaliev N. H. — West-Kazakhstan Agrarian Technical University of Zhanqir Khan. Zhanqir-Khan st. 28, Uralsk, RK.

Tamazyan Gayk — graduate. Saint-Petersburg State University, Mathematics and Mechanics faculty. Department of Statistical Modeling. Zhanqir-Khan st. 28, Uralsk, RK. E-mail: tamazyangayk@gmail.com.