

Новосибирский государственный университет

Кафедра информационной биологии

# **Анализ состава и структуры микробных сообществ районов нефтепроявлений Камчатки**

Студент: Уварова Ю.Е.

Научный руководитель: Старший научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦИГ СО РАН, к.б.н. Брянская Алла Викторовна

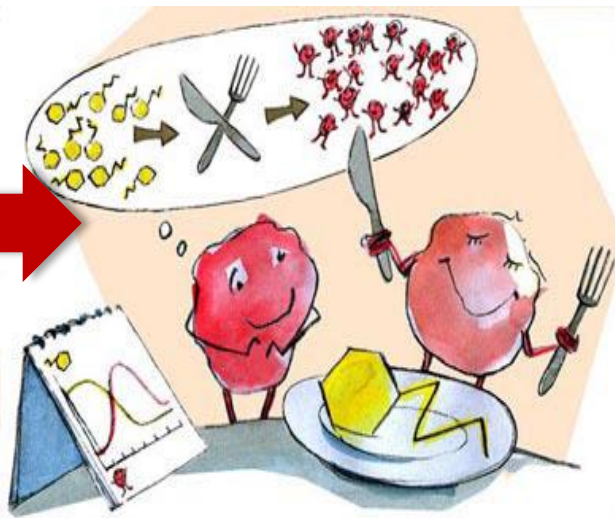
## 2. Введение и актуальность работы



Нефть – одно из важнейших полезных ископаемых, используемых человеком. Биотехнологические методы нефтепереработки являются более экологически чистыми и дешевыми по сравнению с традиционными, и основаны на применении модифицированных и природных микроорганизмов, выделенных из мест естественных нефтепроявлений и обладающих уникальными свойствами.

Микроорганизмы, выделенные из районов нефтепроявлений кальдеры Узон, обладают способностью к росту при низких и высоких pH, высоких температурах, высоком содержании тяжелых металлов и углеводородов.

Почва с разливом нефти



Почва после применения углеводородокисляющих микроорганизмов

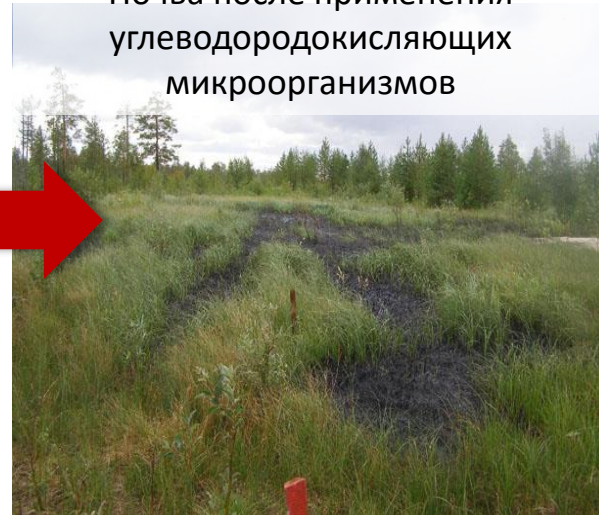


Рисунок 1. Углеводородокисляющие микроорганизмы и примеры их применения

### **3. Цели и задачи дипломной работы**

**Целью** дипломной работы являлось определение состава и структуры микробных сообществ района нефтепроявлений Камчатки; поиск углеводородокисляющих микроорганизмов в районе естественных нефтепроявлений и оценка способности микроорганизмов к деградации углеводородов при различных условиях.

#### **Задачи дипломной работы:**

1. На основе анализа данных пиросеквенирования библиотек гена 16S рРНК провести изучение таксономической структуры и состава микробных сообществ районов нефтепроявлений кальдеры Узон.
2. Описать пути метаболизма сообществ нефтепроявлений на основе данных об их составе.
3. Оценить способность углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из района нефтепроявлений кальдеры Узон, к деградации нефтяных фракций при различных условиях окружающей среды.
4. Провести статистический анализ данных по результатам пиросеквенирования библиотек гена 16S рРНК для 9 проб района естественного нефтяного проявления кальдеры Узон с целью выявления особенностей структуры исследуемых сообществ и определения зависимости состава и структуры микробных сообществ от экологических характеристик (температуры и рН).

## 4. Объект исследования



Название точки	pH точки	Температура точки, °C	Тип точки
УЗ 1-3	3,8	77	Закопушка*
УЗ 2-3	2,8	67	Закопушка
УЗ 3-11	5,9	62	Закопушка
УЗ 4-9	4,4	71	Закопушка
УЗ 4-10	5,4	55	Закопушка
УЗ-5 ящер	4,5	79	Естественный выход
УЗ кот	4,4	65	Естественный выход
УЗ ASS	-	14	Почва, покрытая солями мышьяка
УЗ в2	-	14	Почва с развитием водорослевого мата

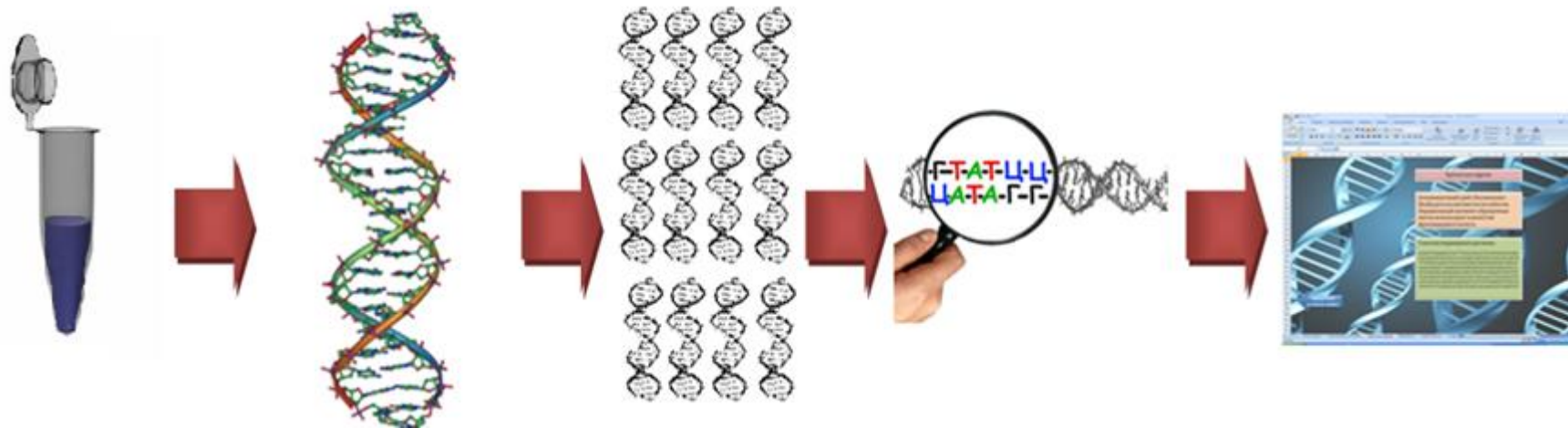
*\*закопушка - ямообразная горная выработка, которая служит для вскрытия почв, залегающих непосредственно под растительным слоем*

Рисунок 2. Типы исследуемых точек.

А – нефтяное поле кальдеры Узон, Б - закопушка, В - естественный термальный выход

## 5. Материалы и методы.

### Биоинформационные методы. Анализ данных пиросеквенирования библиотек гена 16S рРНК



**Сбор  
природных  
образцов**

Лаборатория молекулярных биотехнологий  
ИЦиГ СО РАН

**Выделение  
ДНК**

**Аmplификация**

**Секвенирование**

Лаборатория  
эволюционной  
геномики МГУ

**Создание  
библиотеки  
ридов**

Лаборатория  
молекулярных  
биотехнологий  
ИЦиГ СО РАН

Рисунок 3. Схема формирования библиотеки ридов

\*«Рид» (от англ. *read*) — отдельное прочтение фрагмента ДНК (последовательность нуклеотидных остатков).



# 6. Материалы и методы.

## Биоинформационные методы. Анализ данных пиросеквенирования библиотек гена 16S рРНК

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
TGCCTGTAAGACTGGGATAA.....CTCCGAAACCGGAGCTAA  
TACCGGATAGTTCCTTGAAC.....CGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCA  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA  
CCAAGGCGACGATGCGTAG.....CCGACCTGAGAG  
GGTATCGGCCACACTGGG.....ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
```

**Библиотека ридов**

**FastQC**

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGG | ATGTTAGCGGCGGACGGG  
TGCCTGTAAGACTGGGATAA.....CTCCGAAACCGT | GAGCTAA  
TACCGGATAGTTCCTTGAAC.....CGCATGGTTCAA | GGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCA  
.....  
.....  
.....  
.....  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGT | TGGTGACCTAACGGCTCA  
CCAAGGCGACGATGCGTAG.....CCGACCTGAGAG  
GGTATCGGCCACACTGGG.....ACTGAGACACGG | CCCAGACTCCTACG
```

**Отбор последовательностей по качеству (длина более 250 пн)**

**QIIME pick\_otus.py**

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
CGTGCAGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGC  
.....  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTA  
CGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
.....  
.....  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTT  
.....  
.....  
GATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
```

**Кластер 1**

**Кластер 2**

**Разбиение ридов на кластеры**

# 7. Материалы и методы.

## Биоинформационные методы. Анализ данных пиросеквенирования библиотек

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
CGTGC GGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGC  
.....  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTA  
CGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG
```

**QIIME pick\_rep\_set.py**

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
CGTGC GGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGC  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTA  
CGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG
```

**QIIME assign\_taxonomy.py**

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
TGCCTGTAAGACTGGGATAA.....CTCCGAAACCGGAGCTAA  
.....  
.....  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA  
GGTGATCGGCCACTGGG.....ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
```

- Actinobacteria
- Aquificae; Aquificae; Aquificales; Aquificaceae;
- Archaea; Crenarchaeota;
- Bacteroidetes
- Cyanobacteria; Chloroplast;
- Cyanobacteria; Synechococcophycideae; Pseudanabaenales; Pseudanabaenaceae;
- .....
- .....
- .....
- Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;
- Firmicutes; Clostridia; Halanaerobiales; Halanaerobacteriales;
- Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacteriales;
- Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Leptotrichiaceae;

**Список  
операционных  
таксономических  
единиц\***

**Кластер\***

**Выбор репрезентативных последовательностей**

**Определение таксономической принадлежности кластеров**

\*Кластер - совокупность нуклеотидных последовательностей, имеющих сходство более 97%

\*Операционная таксономическая единица – кластер, с определенным таксономическим положением

# 7. Материалы и методы.

## Биоинформационные методы. Анализ данных пиросеквенирования библиотек

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
CGTGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGC  
.....  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTA  
CGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG
```

**QIIME pick\_rep\_set.py**

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
CGTGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGC  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
.....  
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTA  
CGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG
```

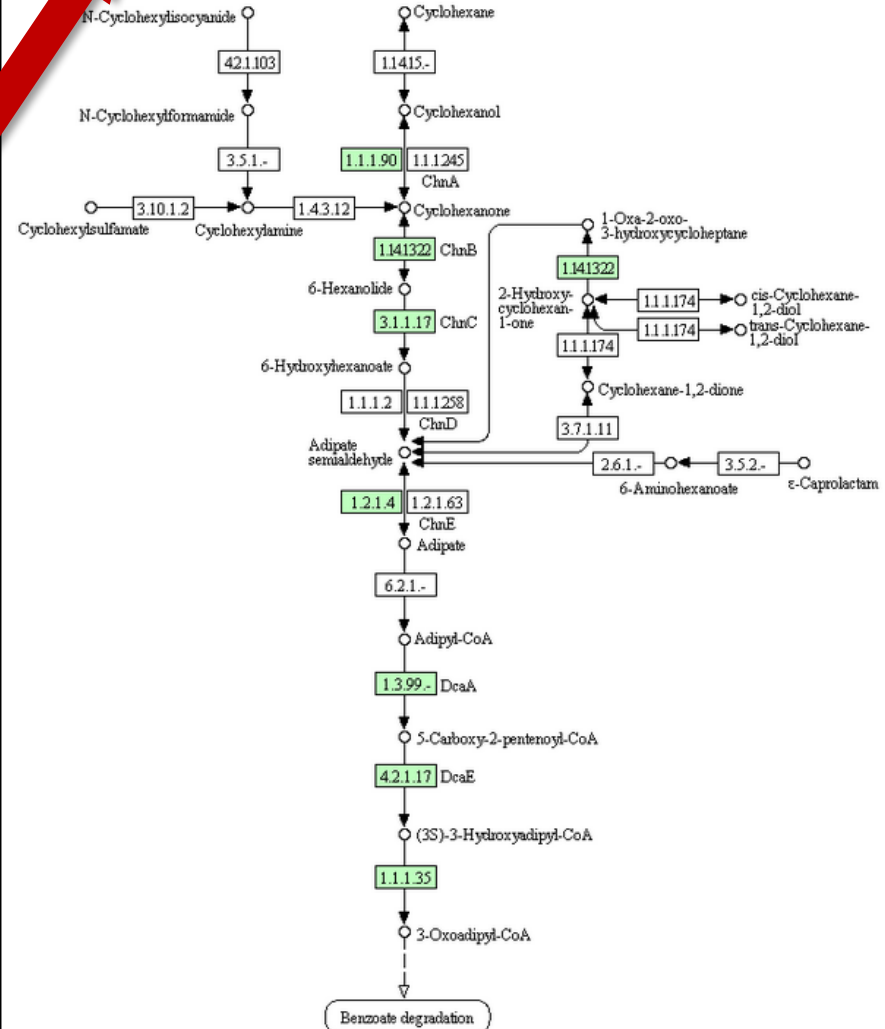
**QIIME assign\_taxonomy.py**

```
TGCCGAGCGGAAGAAGGGA.....GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGG  
TGCCTGTAAGACTGGGATAA.....CTCCGAAACCGGAGCTAA  
.....  
CTTACAGATGGACCCGCGG.....CGCATTAGCTAGTTGGTGTCTAACGGCTCA  
GGTGATCGGCCACTGGG.....ACTGAGACACGGCCCACTCTCTACG
```

Actinobacteria  
Aquificae; Aquificae; Aquificales; Aquificaceae;  
Archaea; Crenarchaeota;  
Bacteroidetes  
Cyanobacteria; Chloroplast;  
Cyanobacteria; Synechococcophycideae; Pseudanabaenales; Pseudanabaenaceae;  
.....  
.....  
Firmicutes; Clostridia; Halanaerobiales; Halanaerobiaceae;  
Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacterales;  
Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Leptotrichiaceae;

**Список  
операционных  
таксономических  
единиц\***

## Поиск потенциальных нефтедеструкторов





# 8. Материалы и методы.

## Микробиологические методы. Работа с коллекцией культур.

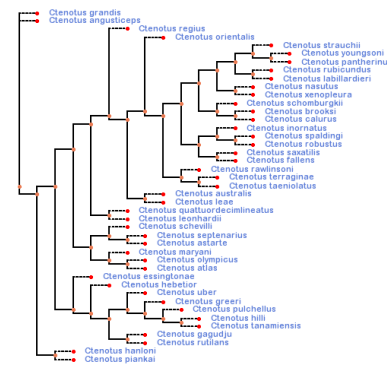
Выделение чистых культур  
Филогенетическая характеристика  
Лаборатория молекулярных биотехнологий  
ИЦиГ СО РАН

Определение способности штаммов к росту на различных углеводородсодержащих субстратах

Определение способности штаммов к окислению углеводов при различных pH среды

Определение способности штаммов к окислению углеводов при различных температурах культивирования

Определение параметров периодического роста штаммов на различных углеводородсодержащих средах



Выделение чистых культур

Филогенетическая характеристика



Работа с чистыми культурами



Культивирование при различных условиях

## 9. Результаты

Было выявлено 334950 последовательностей длиной более 250 пар нуклеотидов.  
Всего получено 1104 операционные таксономические единицы.

	<b>Проба</b>	<b>Количество последовательностей</b>	<b>Операционные таксономические единицы</b>	<b>Индекс Шеннона (H)</b>
Закопушки	УЗ_1-3	37597	102	2,403
	УЗ_2-3	29404	177	3,579
	УЗ_3-11	34153	85	3,433
	УЗ_4-9	35763	206	2,731
	УЗ_4-10	44969	150	1,959
Естественные выходы	УЗ_5ящер	41817	130	2,302
	УЗ_кот	33436	55	2,086
Почвенные образцы	УЗ_в2	48202	92	3,222
	УЗ_ASS	29664	106	3,070

# 10. Результаты

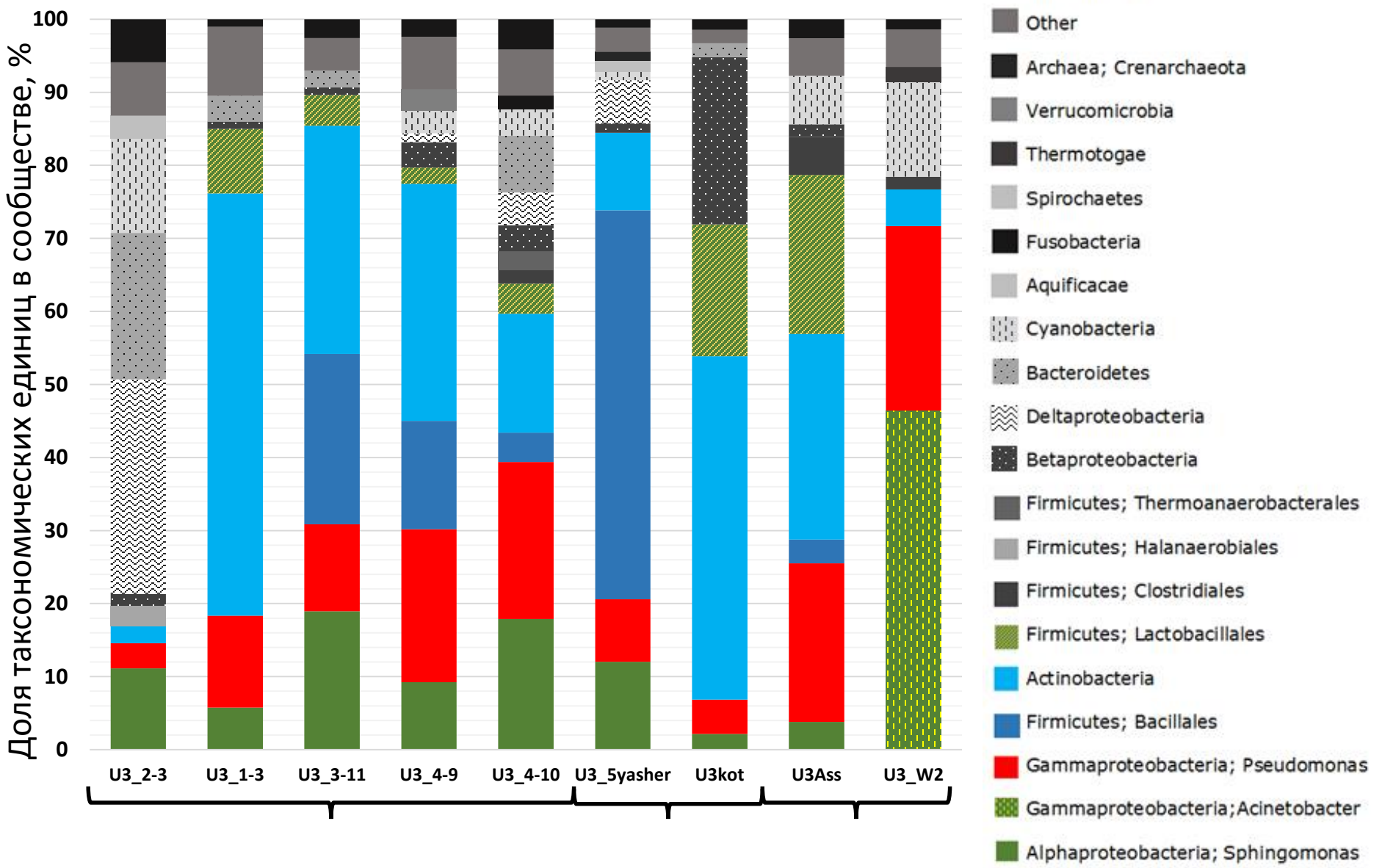


Рисунок 4. Сравнительная диаграмма, отображающая альфа-разнообразие микроорганизмов в каждой точке (черные скобки объединяют точки одного типа, красные скобки объединяют комплексы микроорганизмов)

# 10. Результаты

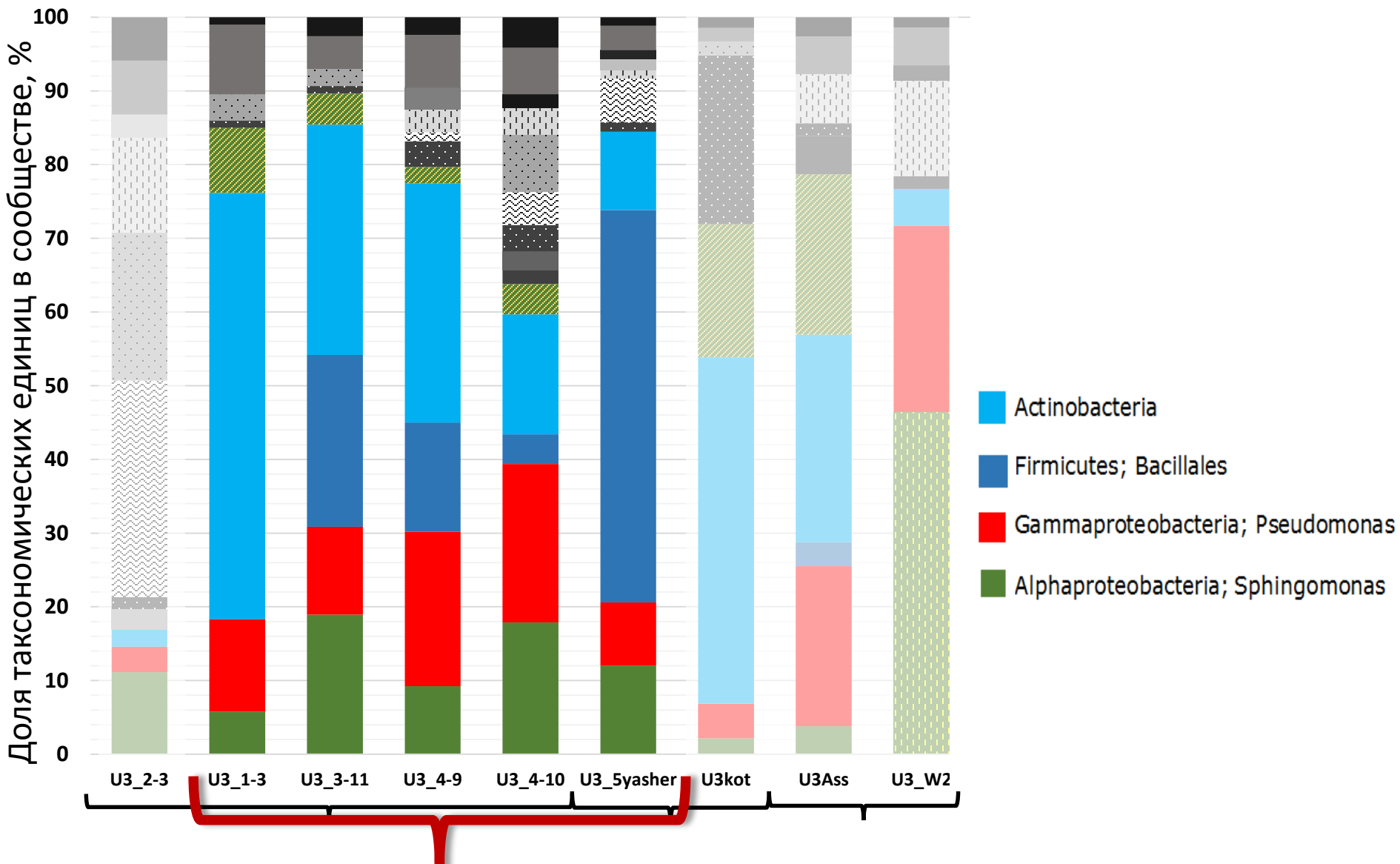


Рисунок 4. Сравнительная диаграмма, отображающая альфа-разнообразие микроорганизмов в каждой точке (черные скобки объединяют точки одного типа, красные скобки объединяют комплексы микроорганизмов)

# 10. Результаты

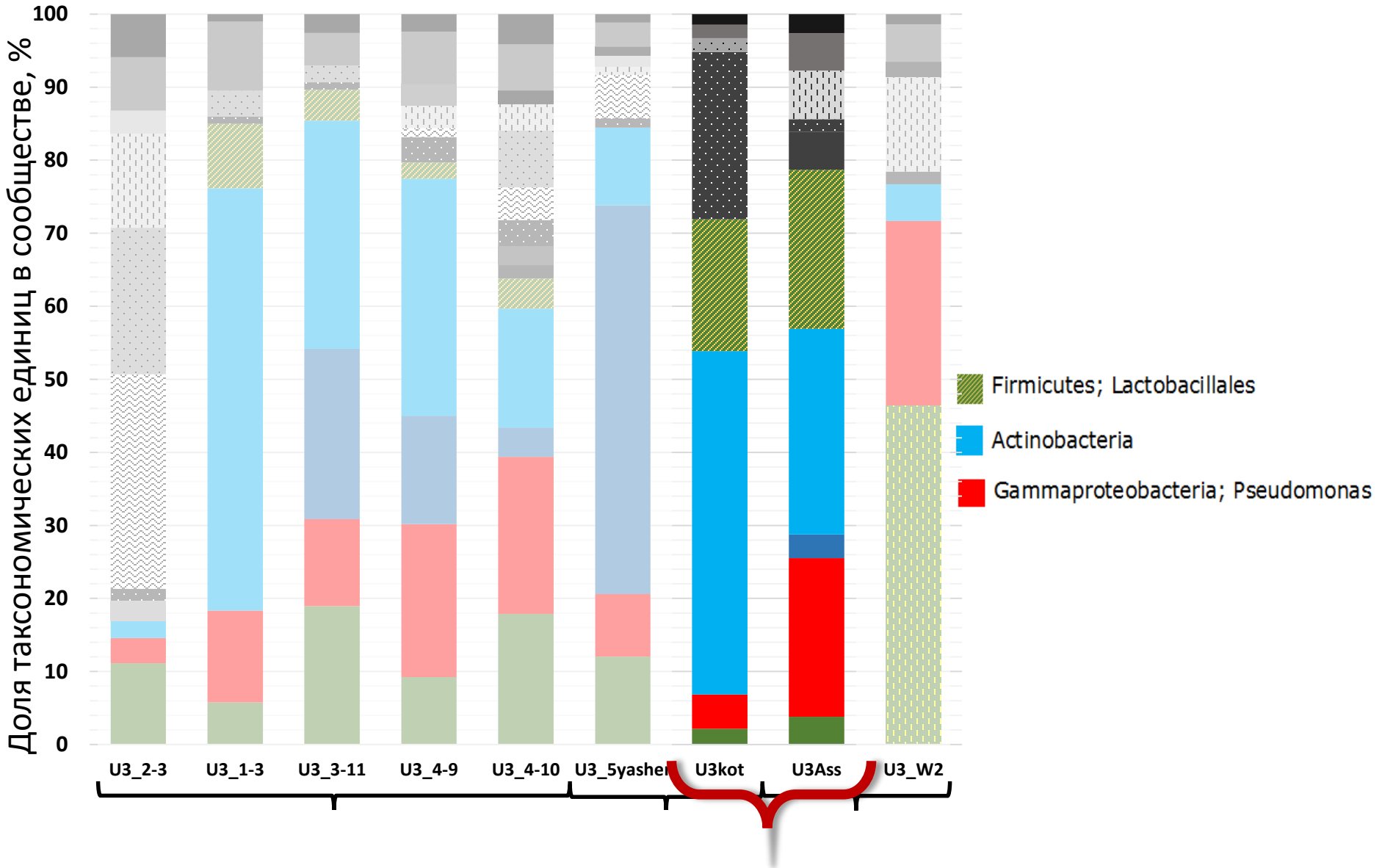


Рисунок 4. Сравнительная диаграмма, отображающая альфа-разнообразие микроорганизмов в каждой точке (черные скобки объединяют точки одного типа, красные скобки объединяют комплексы микроорганизмов)



# 11. Результаты статистического анализа

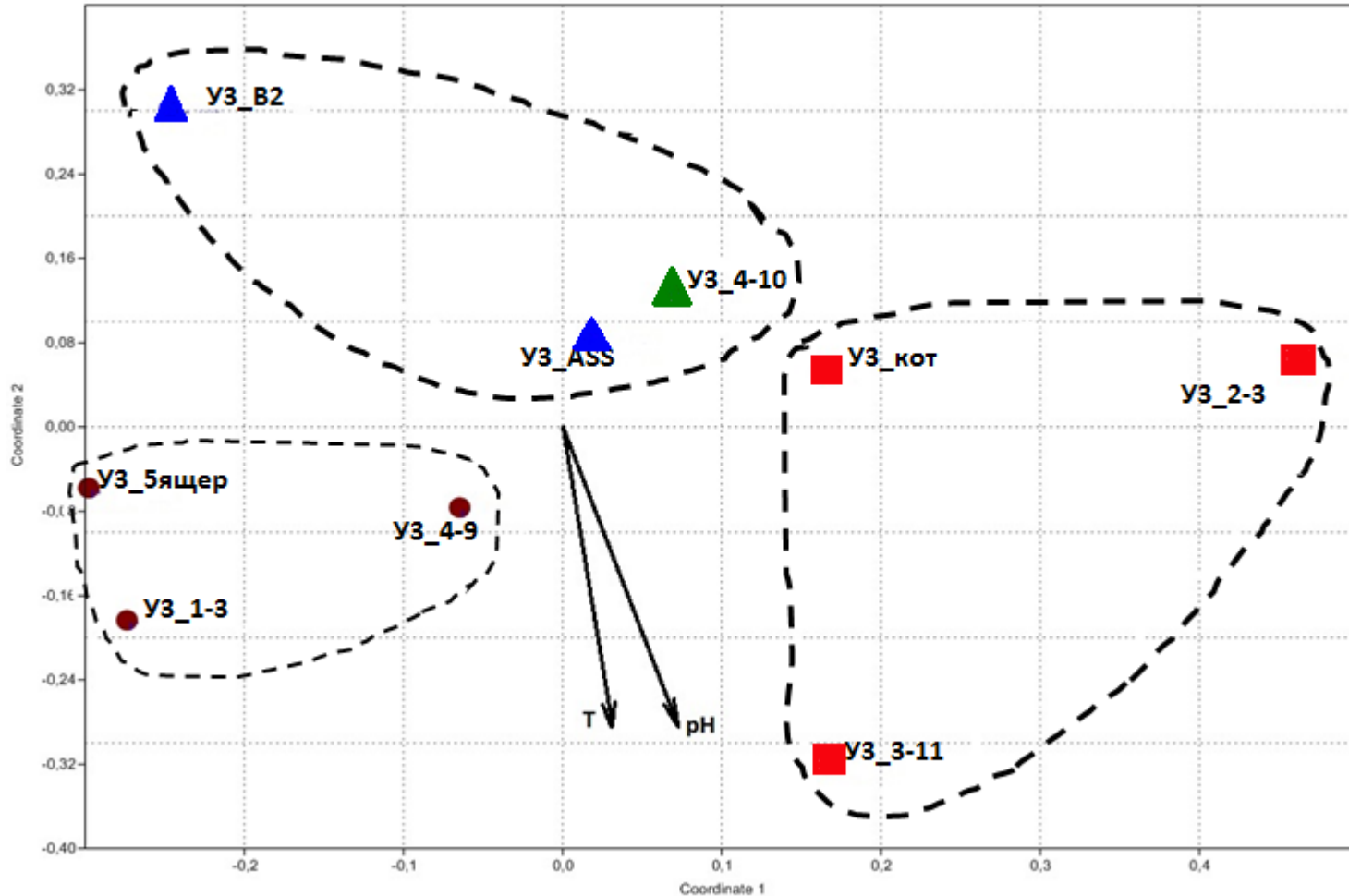


Рисунок 5. Результат многомерного анализа данных на основании индекса Брея-Кёртиса, одним цветом выделены точки, имеющие близкие значения температуры (темно-красный - температура выше 70°C, красный - температура от 60 до 70°C, синий и зеленый - температура ниже 60°C).

## 12. Дегградация компонентов нефти углеводородокисляющими микроорганизмами при различных условиях

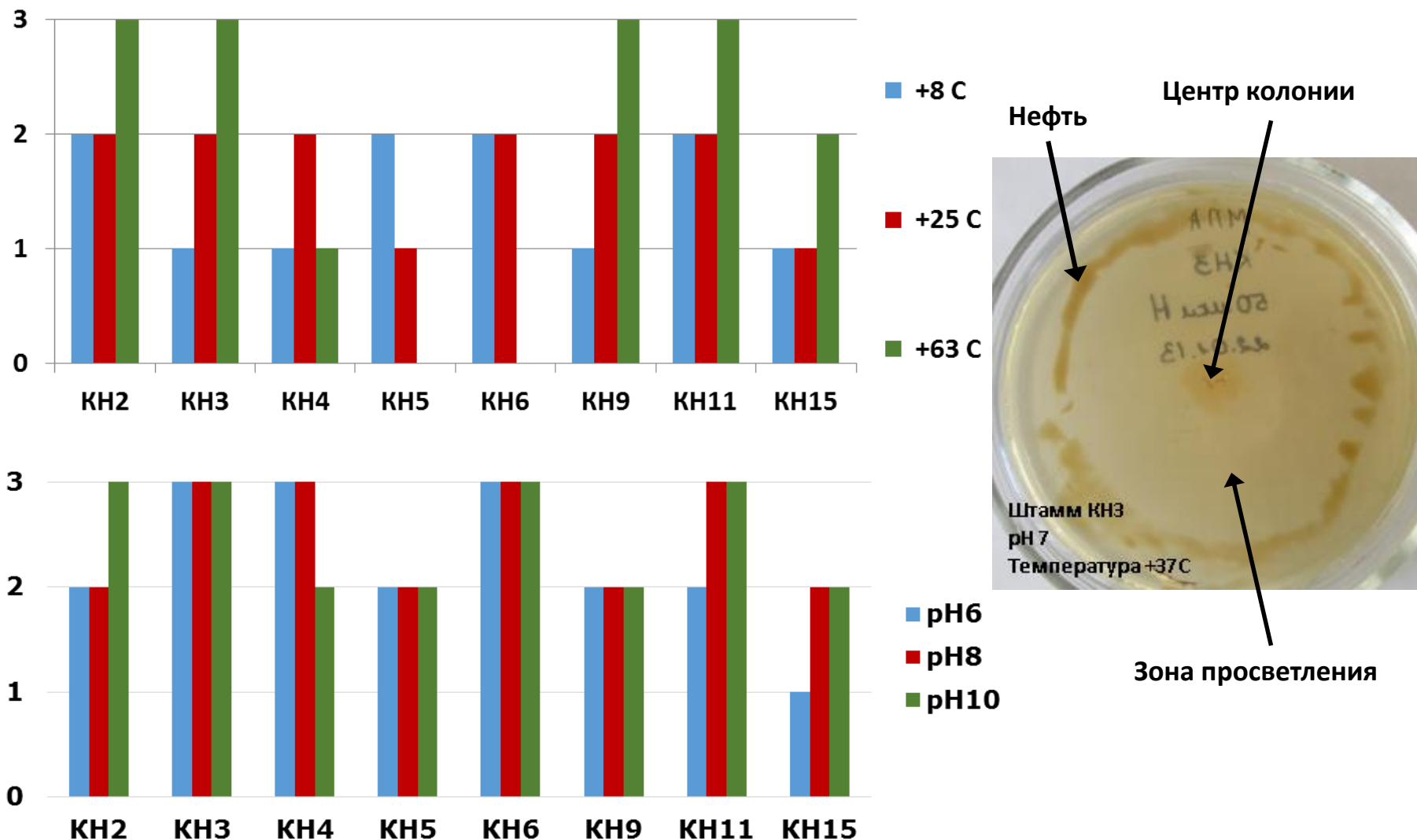
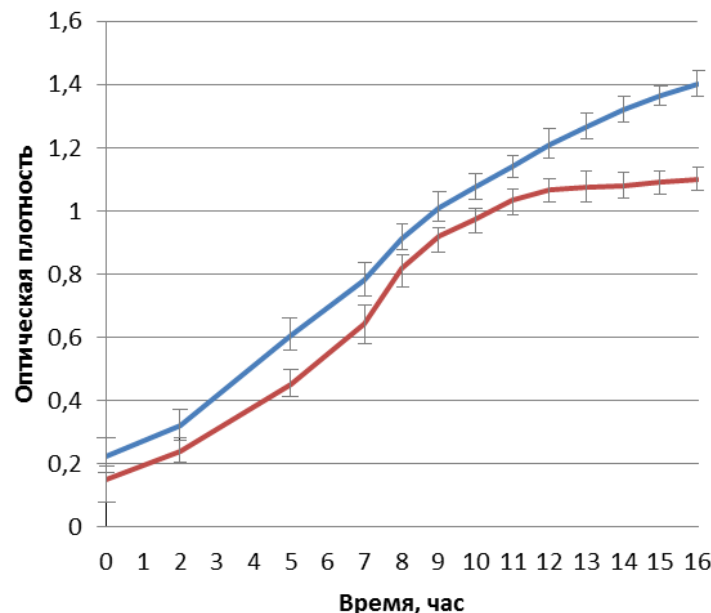
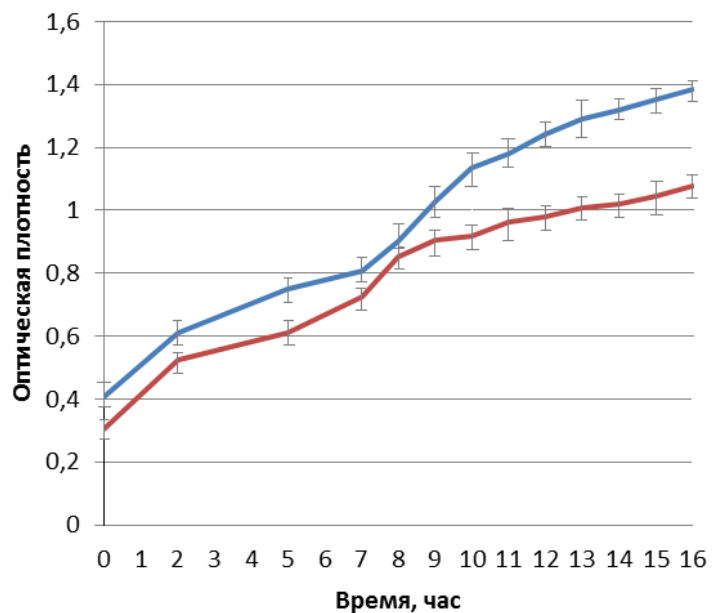


Рисунок 7. Рост исследуемых штаммов при различных условиях культивирования. 0 – отсутствие роста, зона просветления менее 1 см, 1 – диаметр зоны просветления 1-3 см, 2 – диаметр зоны просветления 3-5 см, 3 – диаметр зоны просветления 5-9 см. Диаметр чашки 9 см

### 13. Деградация компонентов нефти углеводородокисляющими микроорганизмами при различных условиях

А



Б

	А	В	С	Д	Е
1	№ штамма	Вазелиновое масло	Чистая нефть	Дизельное топливо	
2	КН1	+	+	+	
3	КН2	+	+	+	
4	КН3	+	+	+	
5	КН4	+	+	+	
6	КН5	+	+	+	

Рисунок 8. А -Кривые роста микроорганизмов на среде Ворошиловой-Диановой с добавлением вазелинового масла (голубая линия) и дизельного топлива (красная линия). Слева – штамм КН1, справа – КН9. Б – фрагмент таблицы, отображающий использование различных субстратов в качестве единственного источника углерода

## 14. Выводы

1. На основе анализа данных пиросеквенирования библиотек варибельного участка V3-V4 гена 16S рРНК были подробно изучены состав и структура микробных сообществ нефтяной площадки кальдеры Узон. В 9 исследованных точках было выявлено 334950 нуклеотидных последовательностей, которые были разделены на 1104 оперативные таксономические единицы.
2. По результатам анализа таксономического состава сообществ и проведенного статистического анализа данных установлено, что в исследуемых 9 точках присутствуют 2 комплекса потенциальных нефтедеструкторов: 1. *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*), *Actinomycetales*, *Bacillus*, *Pseudomonas*; 2. *Actinomycetales*, *Lactobacillales*, *Acinetobacter*. Состав и структура комплексов нефтедеструкторов, как и в целом состав исследуемых сообществ обусловлены температурой среды и типом пробы.
3. В исследуемых сообществах обнаружены минорные нуклеотидные последовательности, принадлежащие микроорганизмам, потенциально способным к деструкции углеводов: *Thermoanaerobacter uzonensis*, термофильным археям порядка *Thermoproteales*, термофильным сульфатвосстанавливающим бактериям *Thermodesulfobacteria* и др.
4. Установлено, что 16 штаммов, выделенных из районов нефтепроявлений кальдеры Узон, способны к использованию различных углеводородсодержащих субстратов в качестве единственного источника углерода. Установлены параметры роста штаммов на средах с углеводородами.
5. Штаммы, выделенные из районов нефтепроявлений, обладали способностью к деградации нефтяных углеводородов в широком диапазоне температур и широком диапазоне pH.

## **15. Благодарности**

Студент благодарит руководителя лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦИГ СО РАН Пельтека С.Е. и сотрудников лаборатории, особенно Розанова А.С., Малуп Т.К., Пфейфер В.И., Косик Л.И.; сотрудника лаборатории компьютерной протеомики ИЦИГ СО РАН Иванисенко Т.В.

## **Публикации**

Брянская А.В, **Уварова Ю.Е.**, Слынько Н.М., Демидов Е.А., Розанов А.С., Пельтек С.Е. Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводов микроорганизмами /Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014

## **Конференции**

**Уварова Ю.Е.** Угледородоокисляющие микроорганизмы Камчатки //51-я Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», Биология/Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2013, С.100.

Брянская А.В., Розанов А.С., Малуп Т.К., Старостин К.В., Демидов Е.А., Шеховцов С.В., Мещерякова И.А., Горячковская Т.Н., Банникова С.В., Сушенцева Н.Н., Демидова Е.А., Голубева Е.С., **Уварова Ю.Е.**, Пельтек С.Е. Характеризация коллекции экстремофильных микроорганизмов ИЦИГ СО РАН / VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы, Тезисы докладов / Ростов-на-Дону, 2014, С. 141.



