



УДК: 574.1:631.46:577.34

ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ МЕТРИК РІЗНОМАНІТТЯ МІКРОБІОМІВ ЗАБРУДНЕНИХ РАДІОНУКЛІДАМИ ҐРУНТІВ

О. Ю. ПАРЕНЮК, кандидат біологічних наук
ORCID 0000-0002-9057-8441

І. О. СІМУТІН
ORCID 0000-0001-9813-7280

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Д. О. САМОФАЛОВА
ORCID 0000-0002-5777-2189

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

<https://doi.org/10.31548/bio2018.05.010>

Проаналізовано біоінформатичні підходи до визначення основних екологічних характеристик (альфа і бета різноманіття) мікробіомів, отриманих в результаті секвенування ДНК ґрунтових мікроорганізмів. Підбрано методiku, що забезпечує найвищу якість і достовірність вихідних даних. В результаті аналізу альфа та бета-різноманіття мікробіому при використанні програми QIIME отримані дані, що свідчать про первинне формування середовища, придатного для майбутнього існування більшого різноманіття мікроорганізмів.

Ключові слова: мікробіом ґрунту, радіонуклідне забруднення, біоінформатичні методи

Вступ. Коректна оцінка різноманіття, отримана в результаті біоінформатичного аналізу мікробіомів, є важливою запорукою валідності отриманих даних та одержанню адекватних результатів аналізів. Шляхи *in silico* обрахунку основних індексів різноманіття, що використовуються в мікробній екології, є важливою складовою визначення основних функцій мікроорганізмів у ґрунтах, що досліджуються. Можливості прогнозування впливу мікроорганізмів на кислотність ґрунтів, уміст і форми органічної речовини, безпосереднє підвищення або пониження біологічної доступності певних сполук, зокрема радіонуклідів, визначають актуальність дослідження та побудови бази

даних, що вміщуватиме відомості про наявні у ґрунті бактерії, їх належність до певних функціональних груп і місце кожної з таких груп у завершальній (редукуючій) ланці біологічного колообігу (Pareniuk et al., 2015).

У попередніх публікаціях було висвітлено особливості побудови і адаптації методик аналізу даних, отриманих у результаті секвенування ДНК, виділеного із забрудненого радіонуклідами субстрату (Паренюк et al., 2017). Поточна робота розкриває подальші кроки, що було використано для обрахунку альфа і бета різноманіття досліджуваних мікробіомів, передбачення функцій тощо.

Метою роботи було обрано розробити методiku визначення альфа і бета різноманіт-



тія мікробіомів, отриманих у результаті секвенування бактеріальної ДНК, виділеної зі зразків, відібраних із саркофагу над зруйнованим 4-м енергоблоком ЧАЕС, а також розробити методологію для передбачення функцій.

Запропонована послідовність дій буда протестована та дозволила отримати валідні та достовірні дані.

Матеріали і методи дослідження. На попередніх стадіях роботи було відібрано 8 зразків субстрату на стандартних маршрутах моніторингу Інституту проблем безпеки АЕС НАН України у приміщеннях зруйнованого 4-го енергоблоку ЧАЕС. Зразки 2, 5 та 8 були відібрані із приміщення під шахтою реактора, 4 та 12 – за межами об’єкту «Укриття» і використовувалися як контроль, 11 та 7 – із внутрішніх виходів шахт системи моніторингу реактора «Фініш», 13 – із дренажної труби, що виходить з об’єкту «Укриття».

У результаті секвенування описаних зразків по амплікону 16S рРНК були отримані 12 файлів за прямими і зворотними рідями з використанням платформи Illumina MiSeq. Отримані дані секвенування ДНК були представлені у FastQ форматі, для аналізу використовувалися зразки тільки прямих прочитань - *R1 (Паренюк et al., 2017).

Для аналізу був використаний комп’ютер наведеної нижче конфігурації:

1. Процесор – 2.5 GHz Intel Core I7.
2. Пам’ять – 16 GB 1600 MHz DDR3.
3. Графіка – Intel Iris Pro 1536 MB.

Версія операційної системи: MAC OS Sierra V10.12

Статична обробка даних була здійснена за допомогою програмних пакетів FastQC (S. Andrews, n.d.) та QIIME (Caporaso et al., 2010; Kuczynski et al., 2012).

Результати дослідження та їх обговорення. Розрахунок альфа-різноманітності мікробіому. Альфа-різноманітність (англ. alpha-diversity) – показник складності мікроценозу (Pielou, 1975). У найпростішому варіанті альфа-різноманітність вимірюється числом видів на одиницю площі. Однак частіше

одночасно з оцінкою числа видів проводиться облік їх співвідношення, тобто різноманітності кількісних вкладів або вирівненності видів (англ. evenness or equitability). В останньому випадку можливі дві теоретичні моделі, з якими порівнюється емпіричний розподіл: упорядкування видів (англ. ranked-abundance list) за числом зустрінутих особин (зазвичай для малого числа видів в біоценозі) і розподіл видового різноманіття (англ. species-abundance distribution за кількістю видів, представлених певною кількістю індивідумів. В нашому випадку ми розраховували альфа-різноманіття для отримання даних для порівняння багатства угруповань.

Альфа-різноманіття дає можливість оцінити біорізноманіття (number of taxa) у межах однієї спільноти та розрахувати кількість детектованої таксономії у конкретному зразку. Альфа-різноманіттяу QIIME має низку можливих метрик для оцінки різноманіття, а саме: *chao1*, *shannon*, *simpson*, *dominance* і т.д. (<http://scikit-bio.org/docs/latest/generated/skbio.diversity.alpha.html>)

Для розрахунку альфа-різноманіття, був застосований модуль QIIME *alpha_diversity.py* (http://qiime.org/scripts/alpha_diversity.html), що потребує на вхід *.biom таблиці та додаткову інформацію, щодо кладистики в форматі *.tre. Для кожного зразку альфа-різноманіття було розраховано наступною командою:

```
(qiime1)./alpha_diversity.py -i otu_table.biom -m chao1,PD_whole_tree,shannon,simpson,dominance -o (output directory).
```

Як видно з команди, для розрахунку були обрані наступні метричні параметри(m): *chao1*, *PD_whole_tree*, *shannon*, *simpson*, *dominance*.

Графіки для альфа-різноманіття були побудовані у пакеті R *phyloseq* (McMurdie, Holmes, Kindt, Legendre, & O’Hara, 2013) функцією:

```
plot_richness (otu,x=»samples»,measures=c («Chao1»,»Shannon»,»Simpson»)).
```

Для оцінки наявності рідкісних видів в досліджуваних мікробіомах використовували індекс Чао (*chao1*) (Chao, Chiu, &

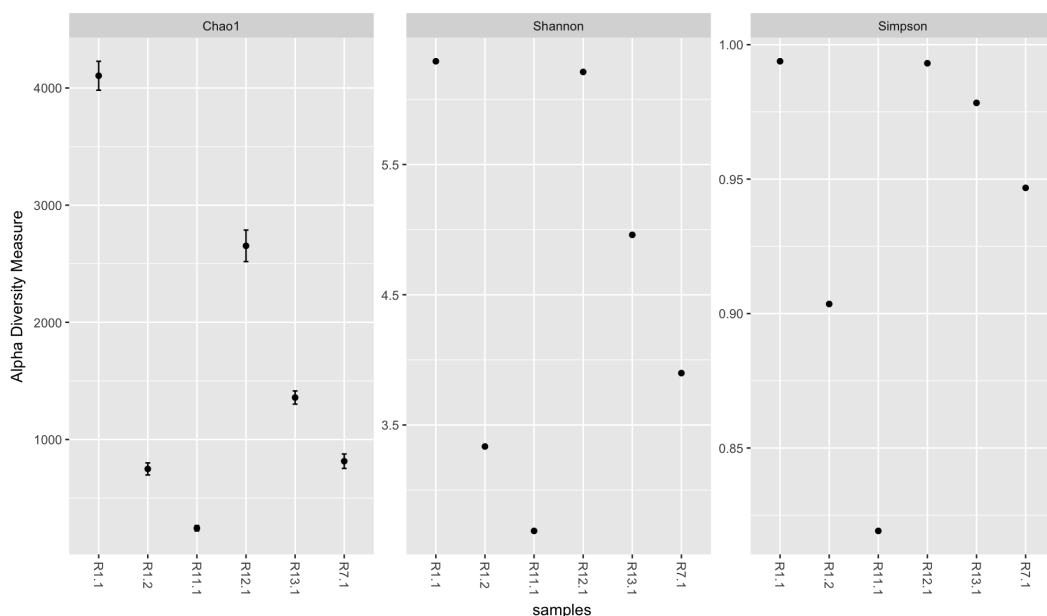


Рис. 1. Графіки для Chao1, Shannon, Simpson.

Hsieh, 2012). Індекс Шеннона (I_S) і домінування Simpson (Hill, 1973) – для визначення ступеню рівномірності розподілу родин у зразку та наявності явних домінантів відповідно. Загальну довжину гілок філогенетичного дерева (PD_whole_tree) використовували як міру таксономічної спорідненості в середині кожного зразка. З отриманих даних видно, що зразки R4 та R12 є найбільш збалансованими і вирівняними: загальна кількість представлених родин (відповідно 269 і 207) дозволяє нормальне функціонування мікробіому, знижуючи вклад моноштамів у його формування (Ід складає відповідно 0,006177 і 0,006915).

Розрахунок бета-різноманіття мікробіому. Бета-різноманіття дозволяє оцінити різноманіття між декількома спільнотами. Так як і альфа-різноманіття, бета-різноманіття має свої специфічні метричні параметри: *bray_curtis*, *chisq*, *euclidean*, *kulczynski*, *binary_sorensen_dice* та інші.

Для розрахунку бета-різноманіття був застосований модуль QIIME beta_diversity.

py (http://qiime.org/scripts/beta_diversity.html), що потребує на вхід *.biom таблиці та вказані метричні параметри. Для розрахунку бета-різноманіття була застосована злита *.biom таблиця (merged), що містить *.biom таблиці всіх зразків. Розрахунок був здійснений наступною командою:

```
(qiime1)./beta_diversity.py -i merged.biom -m bray_curtis, chisq, euclidean, kulczynski, binary_sorensen_dice -o output_directory
```

Як видно з команди, для аналізу були обрані наступні метричні параметри: *bray_curtis*, *chisq*, *euclidean*, *kulczynski*, *binary_sorensen_dice*.

Візуалізацію бета-різноманіття було зроблено за допомогою PCoA графіків за допомогою модуля QIIME principal_coordinates.py (http://qiime.org/scripts/principal_coordinates.html) та make_2d_plots.py (http://qiime.org/scripts/make_2d_plots.html). Та було виконано наступними командами:

```
(qiime1)./principal_coordinates.py -i beta_diversity_outputs -o output_directory
```

```
(qiime1)./make_2d_plots.py -i PCoA_output_directory -m metafile.txt -o output_directory
```

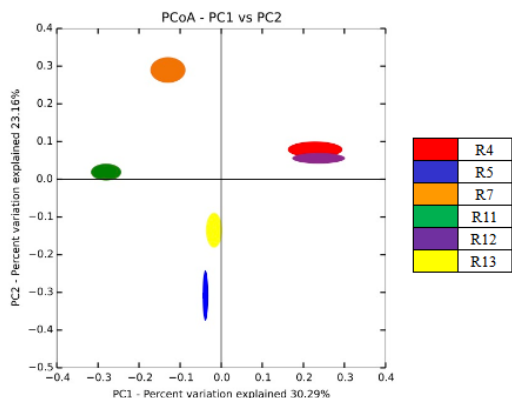


Рис. 2. РСОА графік для досліджуваних зразків.

Бета-різноманіття це показник, що вимірює ступінь диференційованості видів за градієнтом місцеперебування, тобто швидкість зміни видового складу мікробіому за просторовими і екологічним градієнтами ландшафту. Отримані дані підтверджують диференціацію видів згідно з локалізацією точок відбору зразків. Так, зразки R4 і R12, відібрані із проммайданчика, демонструють тотожність мікробіомів. У той же час, завдяки проведеному аналізу можна побачити паттерни, що не є очевидними за просторо-

вого аналізу. Так наприклад близькість зразка R13, відібраного з точки витоку дренажної труби з середини об'єкту Укриття і R5, відібраного під шахтою зруйнованого реактора дає можливість припустити, що ці два точки пов'язані загальною дренажною системою, хоча, згідно з результатами аналізу вмісту катіонів і радіонуклідів, дренажні води і проходять значну очистку.

У той же час, розташування R11 на графіку свідчить про істотні відмінності мікробіому тут, що може бути наслідком як підвищеного вмісту іону феруму, так і високої поглинутої дози.

Висновки

Отримані дані секвенування мікробіому зруйнованого 4-го енергоблоку ЧАЕС були проаналізовані за якістю секвенування програмним пакетом QIIME, Встановлено, що наведена технологія надає хороші результати для процесінгу даних секвенування бактеріальних біомів. В результаті аналізу альфа та бета-різноманіття мікробіому при використанні програми QIIME отримані дані, що свідчать про первинне формування середовища, придатного для майбутнього існування більшого різноманіття мікроорганізмів.

Література

1. O. Pareniuk, K. Shavanova, J. P. Laceby[et al.]. Modification of ¹³⁷Cs transfer to rape (brassica napus L.) phytomass under the influence of soil microorganisms // Journal of Environmental Radioactivity. 2015. Vol. 149. P. 73–80.
2. О. Ю. Паренюк, І. О. Сімутін, Д. О. Самофалова[et al.]. Підходи до in silico аналізу метрик різноманіття мікробіому забруднених радіонуклідами ґрунтів // Біоресурси і природокористування. 2017. Vol. 9, No. 5–6. P. 10–16.
3. S. Andrews. Babraham bioinformatics - fastqc a quality control tool for high throughput sequence data [Електронний ресурс]. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата звернення 06.12.2018).
4. J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh[et al.]. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature Methods. 2010. Vol. 7, No. 5. P. 335–336.
5. J. Kuczynski, J. Stombaugh, W. A. Walters[et al.]. Using qiime to analyze 16s rRNA gene sequences from microbial communities. // Current protocols in microbiology. 2012. Vol. Chapter 1. P. Unit 1E.5.
6. Pielou E. C. Ecological diversity. New York : John Wiley & Sons, Ltd, 1975. 165 p.
7. P. J. McMurdie, S. Holmes, R. Kindt[et al.]. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, No. 4. P. e61217.
8. A. Chao, C.-H. Chiu, T. C. Hsieh. Proposing a resolution to debates on diversity partitioning // Ecology. 2012. Vol. 93, No. 9. P. 2037–2051.



9. Hill M. O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences // Ecology. 1973. Vol. 54, No. 2. P. 427–432.

References

1. Pareniuk, O., Shavanova, K., Laceby, J. P., Illienko, V., Tytova, L., Levchuk, S., ... Nanba, K. (2015). Modification of ¹³⁷Cs transfer to rape (*Brassica napus* L.) phytomass under the influence of soil microorganisms. *Journal of Environmental Radioactivity*, 149, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.07.003>
2. Паренюк, О. Ю., Сімугін, І. О., Самофалова, Д. О., Рубан, Ю. В., Ілленко, В. В., Нестерова, Н. Г., & Гудков, І. М. (2017). Підходи до in silico аналізу метрик різноманіття мікробіому забруднених радіонуклідами ґрунтів. *Біоресурси і Природокористування*, 9(5–6), 10–16.
3. S. Andrews. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 06.12.2018).
4. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
5. Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2012). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 1, Unit 1E.5. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01e05s27>
6. Pielou, E. C. (1975). *Ecological diversity*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.
7. McMurdie, P. J., Holmes, S., Kindt, R., Legendre, P., & O'Hara, R. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
8. Chao, A., Chiu, C.-H., & Hsieh, T. C. (2012). Proposing a resolution to debates on diversity partitioning. *Ecology*, 93(9), 2037–2051. <https://doi.org/10.1890/11-1817.1>
9. Hill, M. O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54(2), 427–432. Retrieved from http://biocomparison.ucoz.ru/_ld/0/78_hill_obzor.pdf

SUMMARY

O. Pareniuk, I. Simutin, D. Samofalova. *Determination of the basic diversity metrics of radionuclide contaminated soils microbiomes. Biological Resources and Nature Managment. 2018. – 10, № 5–6. P. 77–81. <https://doi.org/10.31548/bio2018.05.010>*

The bioinformatic approaches to determine of the main ecological characteristics (alpha and beta diversity metrics) of microbiomes, obtained as a result of DNA sequencing of radionuclide contaminated substrates were analyzed. As a result of the microbioms alpha and beta analysis, using the QIIME software, it was shown

that environment, formed in the 4th unit of ChNPP is suitable for future existence of a greater variety of microorganisms. A technique has been selected that provides the highest quality and reliability of the source data.

Keywords: soil microbiome, radionuclide pollution, bioinformatics methods

АННОТАЦІЯ

Е. Ю. Паренюк, І. О. Сімугін, Д. А. Самофалова. *Определение основных метрик разнообразия микробиомов загрязненных радионуклидами почв. Биоресурсы и природопользование. 2018. 10, № 5–6. С. 77–81. <https://doi.org/10.31548/bio2018.05.010>*

Проанализированы биоинформатические подходы к определению основных экологических характеристик (альфа и бета разнообразия) микробиомов, полученных в результате секвенирования ДНК почвенных микроорганизмов. Подобрана методика, которая обеспечивает высочайшее качество и достоверность исходных данных. В результате анализа альфа и бета-разнообразия микробиомов

при использовании программы QIIME полученные данные, свидетельствующие о формировании первичной среды, пригодной для будущего населения большим разнообразием микроорганизмов. Было показано, что подобранная методика позволяет получать валидные и достоверные данные.

Ключевые слова: микробиом почвы, радионуклидное загрязнение, биоинформатические методы