ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ, 2019, том 80, № 6, с. 403–417

УДК 579.26:631.46

МЕТАБАРКОДИНГ И МЕТАГЕНОМИКА В ПОЧВЕННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ: УСПЕХИ, ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ

© 2019 г. М. В. Семенов*

Почвенный институт им. В.В. Докучаева
Пыжевский пер., 7, Москва, 119017 Россия
**E-mail: mikhail.v.semenov@gmail.com*

Поступила в редакцию 14.03.2019 г.
После доработки 17.07.2019 г.
Принята к публикации 13.08.2019 г.

Современный прогресс почвенной биологии связан с использованием новых молекулярно-биологических методов, базирующихся на выделении тотальной ДНК из почвы и последующем ее анализе. Двумя главными способами изучения почвенной ДНК микроорганизмов в настоящее время являются метабаркодинг (идентификация состава сообщества путем анализа последовательностей маркерных генов-баркодов) и метагеномика (анализ совокупных геномов сообщества организмов). Эти методы предоставили прямой доступ к колоссальному генетическому разнообразию "некультивируемого большинства" микроорганизмов в почве и стали практически обязательной частью многих исследований в рамках экологии почвенной биоты. В обзоре рассмотрены вопросы применения этих исследовательских методов при изучении экологии и разнообразия почвенных микроорганизмов. Обсуждены проблемы специфики почвы как объекта исследования молекулярно-генетическими методами и связанные с ними методологические ограничения. Рассмотрены успехи, проблемы и перспективы метабаркодинга и метагеномики в почвенно-экологических исследованиях, а также возможности комбинирования данных методов с другими исследовательскими подходами.

DOI: 10.1134/S004445961906006X

Почва является наиболее богатой средой с точки зрения микробного разнообразия. Один грамм почвы может содержать миллиарды или десятки миллиардов прокариотных клеток и несколько километров грибного мицелия (Prosser, 2015). Долгое время изучение микробного состава почв ограничивалось методом культивирования на питательных средах. Однако еще в середине 1980-х годов стало понятно, что те микробные колонии, которые культивируются на чашках Петри, составляют лишь незначительную долю (0.1–5%) от общего разнообразия микроорганизмов в почве (Torsvik et al., 1990; Torsvik, Ovreas, 2002). Различие между количеством бактериальных колоний на чашках и численностью клеток, наблюдаемых в микроскоп, достигает двух порядков и известно как "большая аномалия подсчета чашечным методом" (Great Plate Count Anomaly; Staley, Konopka, 1985).

Появление молекулярно-биологических методов, базирующихся на выделении тотальной микробной ДНК из почвы и последующем ее анализе, стало новым этапом в развитии почвенной микробиологии. Оказалось, что традиционные представления о таксономическом составе и экологии микробного населения почв требуют пересмотра и переосмысления (Nesme et al., 2016). Двумя главными способами изучения почвенной ДНК микроорганизмов стали анализ ампликонов и метагеномный подход (Nesme et al., 2016). Эти способы предоставили прямой доступ к колоссальному генетическому разнообразию "некультивируемого большинства" микроорганизмов в почве. Последние исследования показывают, что в десяти граммах почвы может находиться до 10^6 видов бактерий и архей (Prosser, 2015). Поэтому анализ ампликонов (метагенетика) и геномов (метагеномика) в настоящее время являются доминирующими исследовательскими подходами в почвенной микробиологии и своеобразной отправной точкой, дающей начало новым исследовательским направлениям и гипотезам. Несмотря на большие перспективы молекулярных методов, по-прежнему непонятно, как и за счет чего поддерживается такое таксономическое обилие в почве, как связаны состав и богатство микроорганизмов с выполняемыми ими экосистемными функциями. В данном обзоре рассмотрены вопросы терминологии, специфики почвы как объекта исследования метагенетики и метагеномики, а

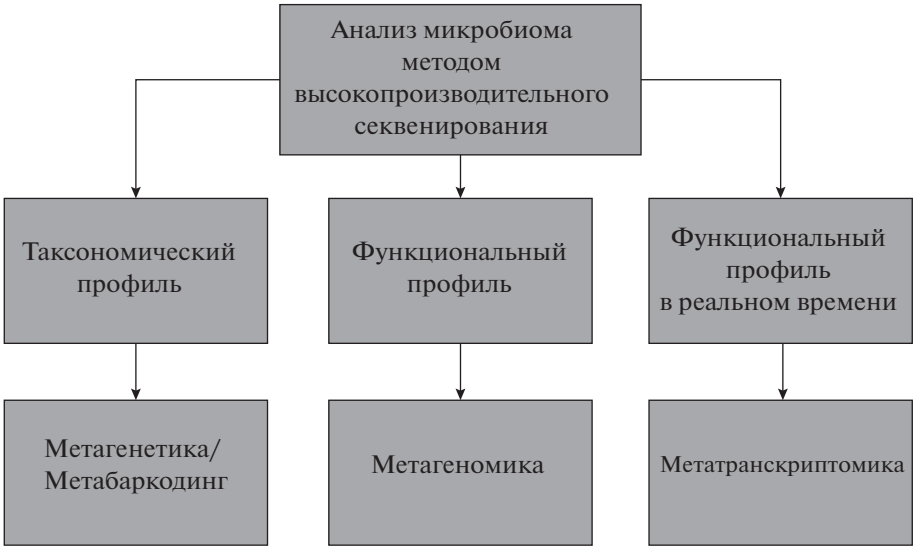

Рис. 1. Структура методических подходов, применяемых при анализе микробиома с использованием высокопроизводительного секвенирования (по: D'Amore et al., 2016; Knight et al., 2018). На оригинальной схеме вместо термина "метагенетика" для наименования подходов по анализу таксономического профиля авторы употребляют термин "анализ маркерных генов".

также успехов, проблем и перспектив данного научно-исследовательского подхода.

МЕТАГЕНОМИКА И МЕТАБАРКОДИНГ – ЧТО МОЖНО НАЗЫВАТЬ ЭТИМИ ТЕРМИНАМИ И ГДЕ ИХ ГРАНИЦЫ?

Проблема терминологии в отношении метагеномики касается не только почвенной микробиологии, но и всего направления в целом. Впервые термин "метагеномика" был предложен в 1998 г. (Handelsman et al., 1998) с целью обозначить исследования, в которых проводится анализ коллективных геномов, полученных из образцов окружающей среды. Термин был ярким и удачным, но определение метагеномных исследований оказалось достаточно общим, что повлекло за собой различные вариации трактовок. В связи со многими проблемами и ограничениями, особенно при исследовании сложных объектов (в том числе почв), под метагеномным подходом часто стали понимать "широкий спектр различных молекулярных методов получения и анализа генетической информации о микробном сообществе непосредственно из окружающей среды", в том числе при анализе отдельных генов, например 16S рРНК (Основные достижения..., 2004, с. 9). Такая трактовка метагеномики до сих пор популярна и используется даже в последних публикациях (например, Kumar et al., 2018; Wolinska et al., 2018; Abia et al., 2019), но не соответствует изначальному смыслу термина. В 2004 г. автором термина было сделано уточнение, что метагеномика не включает в себя исследования, основанные на амплификации, поскольку эти методы не предоставляют геномную информацию за пределами целевых генов (Riesenfeld et al., 2004). Было также отмечено, что хотя при ампликонном секвенировании формально анализируется метагеномная ДНК, реальным объектом изучения в этом случае являются маркерные гены и их ампликоны, и такой анализ нельзя считать метагеномикой (Esposito, Kirschberg, 2014).

Развитие технологий секвенирования за последнее десятилетие значительно расширило глубину полногеномного секвенирования методом дробовика (shotgun sequencing), благодаря которому появилась возможность изучать тысячи геномов разных групп живых организмов в образце. При секвенировании методом дробовика геномы разрезаются случайным образом на фрагменты, которые затем секвенируются и собираются в контиги – наборы длинных перекрывающихся фрагментов ДНК. Секвенирование методом дробовика позволяет изучать непосредственно **метагеном** – совокупный геном какого-либо сообщества организмов. В этом случае речь идет уже не об одном конкретном маркерном гене, как, например, при анализе ампликонов гена 16S рРНК. Таким образом, метагеномика и метагеномный подход были очерчены изучением состава метагенома путем секвенирования методом дробовика (Prosser, 2015). Текущая парадигма структуры методических подходов, применяемых при анализе микробиома с использованием высокопроизводительного секвенирования, представлена на рис. 1.

Если принять за основу такую трактовку, анализ ампликонов маркерных генов следует считать

не метагеномикой (Hamady, Knight, 2009; Prosser, 2015; Knight et al., 2018), а метагенетикой (Handelsman, 2009; Fonseca et al., 2012; Esposito, Kirschberg, 2014; Carugati et al., 2015). Если метагеномика изучает набор геномов, то метагенетика – набор отдельных генов (D'Amore et al., 2016; Bohan et al., 2017). Стоит отметить, что метагенетика является устоявшимся термином лишь среди специалистов, занимающихся генетическим материалом эукариот (Porazinska et al., 2010; Fonseca et al., 2012; Esposito, Kirschberg, 2014; Carugati et al., 2015), тогда как многие микробиологи ограничиваются терминами "анализ маркерных генов" (D'Amore et al., 2016), "микробное профилирование" (Langille et al., 2013), "анализ ампликонов" (Nesme et al., 2016) или "метабаркодинг" (Taberlet et al., 2012).

Метабаркодинг можно считать методическим решением, лежащим в основе метагенетики. Под термином "метабаркодинг" понимается идентификация таксономического состава сообщества из образцов окружающей среды путем амплификации и высокопроизводительного секвенирования последовательностей маркерных генов-баркодов (например, 16S для прокариот, ITS для грибов и 18S для большинства эукариот) (Coissac et al., 2012; Taberlet et al., 2012; Ji et al., 2013). Если речь идет об изучении микробиома, то метабаркодинг можно назвать частью общего исследовательского направления – микробиомики (Bakker et al., 2013).

СПЕЦИФИКА ПОЧВЫ КАК ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТАГЕНОМИКИ И МЕТАБАРКОДИНГА

Почва небезосновательно считается одним из самых сложных объектов для биохимических и молекулярно-биологических исследований (Lombard et al., 2011). Почвы отличаются очень высоким разнообразием, классификация которого сталкивается с очень широким кругом проблем, не решенных до сих пор. Почва как среда обитания микроорганизмов характеризуется громадным количеством случайных и неизвестных физико-химических и биологических факторов, оказывающих влияние на структуру микробиомов. Как следствие, в почвенных метатехнологиях приходится иметь дело с чрезвычайно "шумными" данными, выделение значимого сигнала из которых часто становится весьма сложной статистической и вычислительной задачей. С точки зрения метагеномики и метабаркодинга можно выделить еще три большие группы особенностей почвы и возникающих при ее исследовании методических проблем: 1) неоднородность почвенного покрова, неравномерное размещение микроорганизмов в почвенных агрегатах и возникающая в связи с этим проблема репрезентативности почвенных образцов; 2) адсорбция клеток на почвенных частицах, ингибирование амплификации присутствующими в почве гуминовыми веществами и проблема экстракции и очистки ДНК; 3) высокое разнообразие сообществ, их разный физиологический статус и наличие внеклеточной ДНК (табл. 1). Временная динамика микробных сообществ характерна не только для почв, поэтому в данном обзоре не рассматривается (подробно про проблему временной динамики почвенного микробиома: Bardgett et al., 2005; Lauber et al., 2013).

Почвы характеризуются пространственной неоднородностью даже в пределах небольших масштабов. Неоднородность почвенного покрова отражается в вариабельности физико-химических свойств (содержание органического углерода и азота, pH, влажность, порозность и др.), приводящей к пространственной вариабельности структуры микробных сообществ, обитающих в почве. Дизайн эксперимента должен учитывать неоднородность почвенного покрова, чтобы установить количество повторностей, достаточное для получения корректных результатов.

Еще одной особенностью почв является неоднородность условий внутри почвенных агрегатов. Твердые частицы и агрегаты делят почву на многочисленные частично или полностью изолированные микрозоны, в которых могут создаваться контрастные условия. В пределах агрегатов могут параллельно сосуществовать сотни и тысячи таких микрозон (Звягинцев и др., 2005). Микроорганизмы заселяют эти ниши в соответствии со своими потребностями в питании и выживании, что приводит к неравномерному распределению микробиома внутри почвенных агрегатов (Ranjard, Richaume, 2001; Grundmann, 2004). Например, высокая численность филумов *Gemmatimonadetes* и *Actinobacteria* отмечалась во внутренних зонах микроагрегатов, тогда как основное обилие *Acidobacteria* было связано с крупными фракциями агрегатов (Mummey et al., 2006). Большая неоднородность микробных сообществ в почвенных образцах создается порозностью. Микропоры могут служить в качестве безопасных ниш, защищающих микроорганизмы от поедания почвенными простейшими и животными (Kuikman et al., 1990; Rutherford, Juma, 1992; Wright et al., 1993). Кроме того, микропоры часто содержат повышенные концентрации органического вещества, которое может быть использовано микроорганизмами в качестве субстрата (Ranjard, Richaume, 2001).

Неоднородность численности и состава микроорганизмов внутри агрегатов ставит вопрос о массе почвы, необходимой для метагеномного анализа. Почвенные микробиологи пока не могут ответить, какой массы образец почвы (а также способ отбора образцов) можно считать репрезентативным. Анализ почвенной ДНК, выделенной из образцов почв разного размера (0.01, 0.1,

Таблица 1. Специфика почвы как объекта исследования молекулярно-генетическими методами и связанные с ними методические ограничения

Специфика почвы как объекта метагеномики	Возможные ограничения	Следствия и возможные решения
Высокая неоднородность почвенного покрова	Нерепрезентативная выборка	Увеличение числа повторностей
Неоднородность микробных сообществ внутри почвенных агрегатов	Нерепрезентативный размер образца	Увеличение массы образца, изучение агрегатов разных по размеру классов
Адсорбция клеток и ДНК на поверхности глинистых частиц	Неполная экстракция ДНК из почвы	Более интенсивная гомогенизация почвенных образцов
Обилие гуминовых веществ	Ингибирование амплификации	Дополнительные этапы очистки ДНК от примесей, разбавление
Высокое биоразнообразие	Недостаточная глубина секвенирования	Увеличение количества прочтений ДНК на образец
Остаточная ДНК	Невозможность выявления активного пула организмов	Удаление внеклеточной ДНК, транскриптомный анализ (РНК), DNA-SIP

0.25, 1, 10 г), показал, что лишь образцы массой от 0.25 г демонстрируют сходство по составу микробных сообществ (Kang, Mills, 2006). Некоторые специалисты предлагают увеличивать размер образца до 10 г, чтобы охватить все основное обилие почвенных микрозон и обитающих в них микроорганизмов (Lombard et al., 2011). Тем не менее в настоящее время навеска почвы 0.2–0.5 г признана достаточной и оптимальной для большинства задач. При более глубоком изучении экологии микроорганизмов могут потребоваться навески совсем малой массы, отражающие специфику определенных типов микрозон.

Второй группой проблем, связанных с почвой как объектом метагеномики и метагенетики, являются особенности экстракции и очистки ДНК из почв. Помимо базовой задачи разрушения клеточных стенок, в случае работы с почвой необходимо диспергировать почвенные агрегаты, внутри которых располагаются микробные клетки, десорбировать клетки и молекулы ДНК с поверхности агрегатов, а также произвести очистку ДНК от примесей. Проблема адсорбции ДНК на поверхности частиц характерна, прежде всего, для почв с высокой долей глинистой фракции, для которых “мягкие” способы экстракции чаще всего не обеспечивают необходимого выхода нуклеиновых кислот (Loeppmann et al., 2018). Проблема очистки ДНК от примесей заключается в том, что полученный экстракт может часто содержать большие концентрации гуминовых веществ, которые имеют схожие с молекулами ДНК физико-химические свойства и являются сильными ингибиторами ферментативных реакций (Wilson, 1997). Незначительное загрязнение препаратов ДНК гуминовыми веществами приводит к ингибированию ПЦР-амплификации, что делает невозможным проведение метабаркодинга.

В целом интенсивная гомогенизация и использование специальных наборов для выделения ДНК частично решают данный круг проблем. Однако при работе с высокогумусированными почвами может понадобиться дополнительная очистка образцов ДНК от гуминовых веществ, а также их разбавление для снижения концентрации примесей. При этом на этапе амплификации сильное разбавление растворов ДНК может повлечь за собой увеличение доли контаминантов, генетический материал которых попадает в пробы с реагентами для ПЦР (Salter et al., 2014). Главным источником контаминации в этом случае является полимераза, которая содержит ДНК бактерий, используемых для ее производства (Niimi et al., 2011). Кроме того, одна из основных проблем метагеномики заключается в том, что из-за отличия состава лизирующего буфера для разных наборов (“китов”) характерна разная эффективность экстракции в отношении разных групп микроорганизмов. Это приводит к смещению результатов состава сообществ микроорганизмов и затрудняет сравнение данных в работах, использующих разные подходы. В настоящее время помимо сертифицированной методики ISO (ISO-11063) существуют несколько десятков коммерческих наборов по выделению ДНК из почв: DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen), FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel), Soil DNA Isolation Plus Kit (Norgen Biotek), QuickDNA Fecal/Soil Microbe Kit (Zymo Research), AxyPrep MAG Soil, Stool and Water DNA Kit (Axygen),

GenElute Soil DNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich), HigherPurity Soil DNA Isolation Kit (Canvax), Soil DNA Extraction Kit (Genaid), SoilMaster DNA Extraction Kit (Epicentre), Soil DNA Extraction Kit (IBI). Набор FastDNA SPIN Kit for Soil дает значительный выход ДНК и поэтому может быть использован при количественном выделении ДНК и последующем пересчете в микробную биомассу почв (Semenov et al., 2018a), но в то же время часто требует дополнительной очистки и разбавления образцов. Набор DNeasy PowerSoil Kit лучше очищает растворы ДНК от примесей, но теряет при этом значительное количество генетического материала. Несмотря на это, именно этот набор до сих пор считается эталонным при изучении микробных сообществ почв молекулярными методами и рекомендуется международным проектом Earth Microbiome (http://www.earthmicrobiome.org/).

Наконец, третья группа проблем, связанных с почвой как объектом метагеномного анализа и метабаркодинга, обусловлена очень высоким биоразнообразием, широким диапазоном физиологических состояний живых организмов, а также присутствием в почве внеклеточной ДНК. Почва является самым большим природным банком биоразнообразия: в одном грамме почвы может находиться 10^{14}–10^{16} пар оснований (п.о.) генетической информации (Hirsch et al., 2009; Vogel et al., 2009; Trevors, 2010). До недавнего времени анализ столь больших объемов информации был невозможен в принципе, а секвенаторы не могли охватить даже 0.01% почвенного метагенома. Тем не менее интенсивное развитие технологии секвенирования во второй декаде XXI в. привело к существенному увеличению покрытия метагеномов. Глубина покрытия современных секвенаторов HiSeq составляет 16–120 Gbp (10^{10}–10^{11} п.о.), NextSeq – 105–1500 Gbp (10^{11}–10^{12} п.о.), NextSeqX – уже до 1.8 Tbp (10^{12} п.о.). Таким образом, существующих мощностей уже достаточно, чтобы охватывать метагеномы субстратов с невысоким биоразнообразием, и можно ожидать достаточного покрытия полных метагеномов почв в ближайшем будущем. В этом случае новой проблемой может стать уже хранение новых метагеномных данных.

Одним из главных вызовов почвенной метагеномики и метагенетики является проблема физиологического состояния организмов. Микробные популяции в почве представлены очень широким спектром микроорганизмов, находящихся в четырех физиологических состояниях: активном, потенциально активном, дормантном (покоящемся) и мертвом (Благодатская и др., 2016). Активные микроорганизмы непосредственно участвуют в трансформации органических соединений и связанных с ними биохимических превращениях. Поскольку почва является, как правило, олиготрофной средой, большую часть времени мало обеспеченной доступным субстратом, в основной ее массе доля активных микроорганизмов обычно не превышает 1–5% от всей биомассы. Основная часть живых микроорганизмов (10–60%) представлена потенциально активными микроорганизмами, которые пребывают в состоянии ожидания и могут переключаться на использование поступившего субстрата в сравнительно короткие сроки (от нескольких минут до нескольких часов). Остальная часть жизнеспособных микроорганизмов представлена покоящимися формами, характеризующимися редуцированным дыханием и пониженной метаболической активностью. Микроорганизмы в таком состоянии не участвуют в процессах трансформации органического вещества почвы, но могут внести свой вклад в условиях, способствующих их переходу в активное состояние. Оставшийся пул микроорганизмов представлен мертвыми клетками. Мертвая биомасса не оказывает прямого воздействия на текущие биогеохимические процессы, однако может служить в качестве доступного субстрата. Все четыре типа физиологического состояния микроорганизмов вносят вклад в функционирование почвенных экосистем, и этот вклад различается в зависимости от условий окружающей среды и практики землепользования (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2013). Тем не менее кинетика основных микробиологических процессов определяется активной микробной биомассой, которая является основной движущей силой биогеохимического круговорота элементов в почве (Благодатская и др., 2016).

При оценке почвенного сообщества с помощью метагенетического подхода происходит экстракция и анализ суммарной ДНК, которая включает генетический материал микроорганизмов, находящихся во всех четырех физиологических состояниях. Кроме того, в состав суммарной ДНК может также входить внеклеточная ДНК. На долю ДНК мертвых клеток и внеклеточную ДНК в сумме (так называемая остаточная ДНК) приходится в среднем 40% (Carini et al., 2017). Остаточная ДНК участвует в процессах генетической трансформации и является одним из возможных механизмов почвенной “памяти” (Carini et al., 2017; Ibanez de Aldecoa et al., 2017). В то же время остаточная ДНК на 55% завышает реальное разнообразие бактерий и грибов и приводит к занижению реального обилия активных таксонов, в том числе играющих ключевую роль в экосистемных процессах (Carini et al., 2017). Поэтому при изучении биоразнообразия почв, межвидовых связей и роли микробиоты в почвенно-экологических процессах остаточный генетический материал может мешать интерпретации биологического сигнала на основе ДНК. Возможные решения данных ограничений указаны в разделе “Перспективы

метагеномики и метабаркодинга в почвенно-экологических исследованиях".

Помимо ограничений, вызванных почвенной спецификой, при использовании метабаркодинга необходимо помнить о стандартных проблемах данного подхода, заключающихся как в методической составляющей, так и в последующей биоинформатической обработке. В основе метабаркодинга лежит применение амплификации целевых участков генов, которая приводит к 1) экспоненциальному накоплению ошибок и химерных последовательностей ДНК, 2) смещению относительных обилий видов из-за особенностей, связанных с составом и длиной амплифицируемых фрагментов и 3) ограниченной специфичности используемых праймеров (Schloss et al., 2011). Ни один из универсальных праймеров, используемых в метабаркодинге, не позволяет охватить все группы бактерий, которые обнаруживаются при метагеномном секвенировании ДНК (Hug et al., 2016). Кроме того, численность копий гена 16S рРНК не отражает в полной мере численность самого таксона, поскольку бактерии содержат неодинаковое количество генов 16S рРНК в геноме, которое может варьировать от 1 до 16. Таким образом, численность микроорганизмов с большим количеством 16S рРНК оперонов в клетке завышается (Vetrovsky, Baldrian, 2013). Для решения этой проблемы часто применяют базы данных по геномам бактерий, в которых отражается количество рРНК оперонов в составе генома (Stoddard et al., 2015), и методы, позволяющие пересчитать количество геномов по результатам метабаркодинга в численность клеток (Vetrovsky, Baldrian, 2013; Angly et al., 2014). Данные методы базируются на представлении, что близкородственные бактерии имеют схожее количество рРНК оперонов, однако это верно не для всех таксонов (Louca et al., 2018). При анализе сообществ грибов или других эукариот также возникает проблема подбора маркерных участков для метабаркодинга. Для грибов используется ITS регион, считающийся оптимальным при таксономическом анализе (Schoch et al., 2012), но имеющий множество ограничений. Одним из них являются разные длины участков у разных таксонов, при амплификации которых более короткие последовательности оказываются переоцененными. Для простейших пока еще не существует универсальных праймеров, и метабаркодинг ограничивается анализом таксономических групп более низкого порядка (Geisen et al., 2015).

Биоинформатический анализ накладывает отпечаток на конечный результат метабаркодинга. Существует множество алгоритмов тримминга и фильтрации сиквенсов, удаления ошибок и химерных последовательностей. Алгоритмы аннотации также могут отличаться: наиболее активно применяются BLAST, MAPSeq, QIIME, SINTAX, SPINGO и RDP-классификаторы, а наиболее новым и перспективным считается IDTAXA (Murali et al., 2018). Выбор референтной базы нуклеотидных последовательностей играет определяющую роль в том, каким будет микробный профиль сообщества. Для бактерий используются базы SILVA, RDP, Greengenes и NCBI (Balvociute, Huson, 2017), для грибов – UNITE и Warcup (Xu, 2016). Наконец, в настоящее время происходит постепенный отказ от кластеризации нуклеотидных последовательностей в операционные таксономические единицы (OTU). Вместо этого рекомендуется анализировать точные варианты сиквенсов (ESV; синоним – RSV (рибосомальные варианты сиквенсов)), минуя этап кластеризации (Callahan et al., 2017). В отличие от операционных таксономических единиц, точные варианты сиквенсов могут отличаться даже на одну пару оснований. Хотя это и приводит к проблеме отделения истинных ESV от ошибок при амплификации и секвенировании, в настоящее время разработаны инструменты, позволяющие фильтровать ошибочные последовательности и идентифицировать истинные ESV: Deblur, DADA2 и UNOISE2. ESV-подход предоставляет более точное и подробное таксономическое разрешение, которое позволяет выявлять биогеографические закономерности, проводить различия между патогенными и непатогенными таксонами или различать штаммы, имеющие различные экологические предпочтения. В отличие от OTU, ESV всегда идентичны друг другу, что дает возможность сопоставления результатов, полученных в разных выборках и исследованиях. К недостаткам ESV-подхода можно отнести очень высокие требования к качеству данных секвенирования, а также дивергенцию в рРНК оперонах, при которой один бактериальный геном может содержать 16S рРНК гены, различающиеся на несколько десятков пар оснований. Несмотря на недостатки, ESV-подход считается более корректным при анализе данных высокопроизводительного секвенирования (Knight et al., 2018).

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАГЕНОМИКИ И МЕТАБАРКОДИНГА В ПОЧВЕННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В отличие от метабаркодинга, собственно метагеномные исследования почв еще мало распространены. Это связано, прежде всего, с недостаточной глубиной секвенирования, которую могут дать современные секвенаторы, а также с очень высокой стоимостью такого анализа. Кроме того, большой проблемой является обработка и интерпретация результатов. Получающийся на выходе почвенный метагеном представляет собой иерархическую структуру, в которой идентифициру-

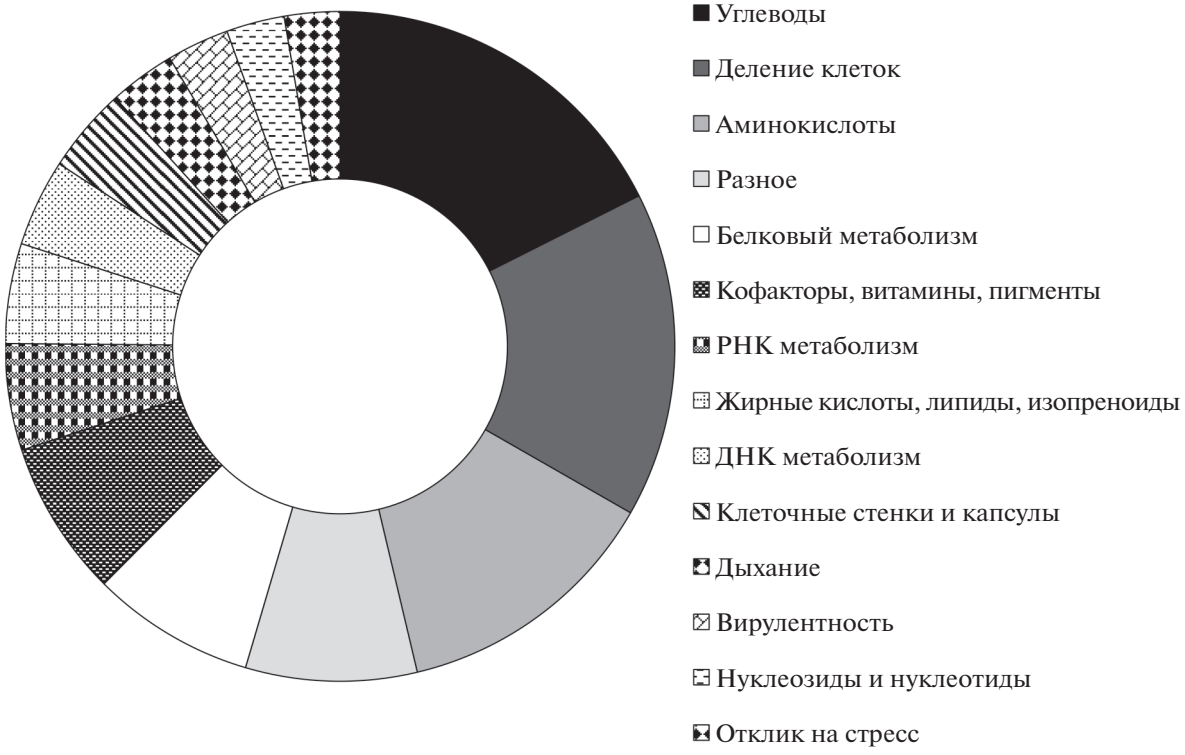

Рис. 2. Метагеном почвы на уровне субсистем генов. Данные получены при помощи полногеномного секвенирования на платформе Illumina HiSeq и биоинформатической обработки в открытом онлайн сервисе MG-RAST. В легенде отражены функции, на основе которых группы генов собраны в субсистемы.

мые гены обитающих в почве организмов собираются в функциональные субсистемы по принципу единства выполняемой функции (рис. 2). В состав метагенома входят функциональные субсистемы генов, ответственные за метаболизм белков, жиров и углеводов, вирулентность, дыхание, отклик на стресс и т.д. На более низком иерархическом уровне возможен анализ доли генов, ответственных за процессы цикла углерода и азота (например, нитрификацию), синтез или разложение определенных соединений. Таким образом, метагеном почвы по факту является ее функциональным профилем, составленным из генетической информации. Помимо информации о разнообразии функциональных генов, анализ метагенома позволяет оценивать структуру почвенных сообществ, причем не определенной ее таксономической группы, как это делает метабаркодинг, а всей биоты, включая грибы, растения, животных и даже вирусы. Метагеномный анализ позволяет проводить реконструкцию преимущественных метаболических путей, реализованную, например, в открытом онлайн сервисе MG-RAST (Keegan et al., 2016). Также преимуществом метагеномики по сравнению с метабаркодингом является отсутствие многих методических проблем, вызванных ошибками амплификации и синтезом химерных последовательностей, приводящих к сдвигам в структуре и завышению реального биоразнообразия.

При использовании метагеномного анализа необходимо помнить, что наличие функционального гена не свидетельствует о его активности. Организмы, которым принадлежат те или иные гены, могут находиться в покоящемся состоянии или быть активными только тогда, когда происходит экспрессия по альтернативным метаболическим путям, которые не требуют функции обнаруженного гена. Ген может не транскрибироваться, транскрипт гена может не транслироваться, а условия окружающей среды могут ингибировать активность гена (Prosser, 2015). Микробные сообщества почвы содержат множество генов, которые ответственны за взаимоисключающие процессы; например, прогнозирование скорости нитрификации на основании обилия функциональных генов невозможно без информации о концентрации кислорода и доступности субстрата. Кроме того, один фермент может участвовать в нескольких разных физиологических путях и вносить вклад в различные функции экосистемы или может сам по себе выполнять более одной функции. Например, фермент нитритредуктаза (кодируемый геном nirK), который восстанавливает нитрит до оксида азота, участвует в окислении аммиака и нитритов, денитрификации и анаэробном окислении

аммония. Аммониймонооксигеназа (кодируется геном amoA) может окислять аммиак, а также метан и ряд органических соединений. Поэтому присутствие многих функциональных генов в метагеноме дает лишь ограниченную информацию о существующих функциональных микробных группах и процессах, происходящих в почве.

Метагеномный анализ в почвенно-экологических исследованиях применяется для определения таксономической структуры сообществ почв разных природных зон и экосистем, а также для поиска связей между экологическими факторами среды, функциональным профилем сообщества и осуществляемыми им процессами и функциями (Baldrian, 2019). Предсказательная способность такого подхода по отношению к почвенным процессам и функциям представляется неоднозначной и в настоящее время заключается в выявлении качественных различий между разными объектами. Сравнение функциональных профилей метагеномов почв арктических и песчаных пустынь показало, что по соотношению субсистем генов разница между почвами столь контрастных экосистем незначительна (Fierer et al., 2012). Сообщества песчаных пустынь характеризуются более высокой долей генов, ассоциированных с осморегуляцией и дормантностью, а также с метаболизмом углеводов и ароматических соединений. В метагеноме арктических пустынь, по сравнению с песчаными, выявлено большее количество генов, ассоциированных с круговоротом питательных веществ и катаболизмом соединений, которые связаны с растениями (Fierer et al., 2012). Вместе с тем метагеномный анализ успешно выявляет различия, возникающие в почвах разных типов землепользования. По сравнению с естественными экосистемами, чернозем под пашней демонстрирует более низкое разнообразие архей и грибов, а также существенные изменения в функционально-генетическом профиле почв (Gorbacheva et al., 2018). В ряду “тропический лес–экосистема после вырубки леса–пашня и пастбище” показано, что сельскохозяйственные и пастбищные почвы характеризуются более низкой численностью микроорганизмов, при этом обладая самым высоким таксономическим и функциональным разнообразием, что является важным атрибутом для поддержания функционирования экосистемы после вырубки леса (Mendes et al., 2015). С другой стороны, экосистемное равновесие в нативной лесной экосистеме поддерживается на основе более низкого разнообразия, но более высокой численности микроорганизмов (Mendes et al., 2015). Еще в одном исследовании показано, что обработка почвы и севооборот вносят существенный вклад в структуру полного метагенома (Souza et al., 2015). В почве при вспашке с оборачиванием пласта оказалось больше микроорганизмов, связанных с разложением растительных остатков и циклами углерода и азота, а также эукариот. При минимальной обработке почвы (no-till) более высокой численностью характеризуются азотфиксирующие ризобии и археи. Стоит отметить, что в данной работе не удалось аннотировать почти половину метагеномных последовательностей, а на бактерии приходилась основная часть всех прочтений ДНК. Суммарный вклад архей и эукариот в почвенный метагеном составил лишь 0.5% от общего количества генов (Souza et al., 2015). Таким образом, в почвенно-экологических исследованиях метагеномный анализ способен выявлять тренды распределения генов при изменении условий среды. Тем не менее получающийся при этом функциональный профиль сообщества отражает лишь его генетический потенциал, но практически не говорит о характере и скорости реальных процессов, протекающих в почве (Prosser, 2015).

Метагеномные исследования весьма эффективны для поиска новых метаболитов (прежде всего, антибиотиков), ферментов и биоактивных молекул (Lorenz, Eck, 2005). Также на основе анализа генов в геноме можно прогнозировать и подбирать условия выделения в чистую культуру некультивируемых микроорганизмов (Pham, Kim, 2012; Vester et al., 2015). Наконец, высокая численность в почве бактерий, продуцирующих антибиотики, делает почву важнейшим резервуаром генов, ответственных за устойчивость к антибиотикам (Schmieder, Edwards, 2012). Данное направление напрямую связано со здоровьем человека, поэтому почвенная метагеномика может быть использована для решения многих задач при клинических исследованиях (Schmieder, Edwards, 2012).

В почвенно-экологических исследованиях более широкое распространение приобрели метагенетические исследования на основе ДНК-метабаркодинга за счет относительной простоты, сравнительно низкой цены и более высокой разрешающей способности. С помощью метагенетического подхода появилась возможность анализировать структуру и разнообразие сообщества грибов, водорослей, протистов и животных в почве. Тем не менее подавляющее количество исследований связано с использованием метабаркодинга для анализа сообществ прокариот – архей и бактерий.

Результатом метабаркодинга является список таксонов с их относительной представленностью в составе сообщества, с помощью которого устанавливаются следующие показатели биологического состояния почв: 1) таксономическая структура сообщества; 2) альфа-разнообразие; 3) степень различий между сообществами разных почв (бета-разнообразие); 4) состав и доля индикаторных таксонов в составе сообщества; 5) сложность и характер межвидовых сетей (networks); 6) состав

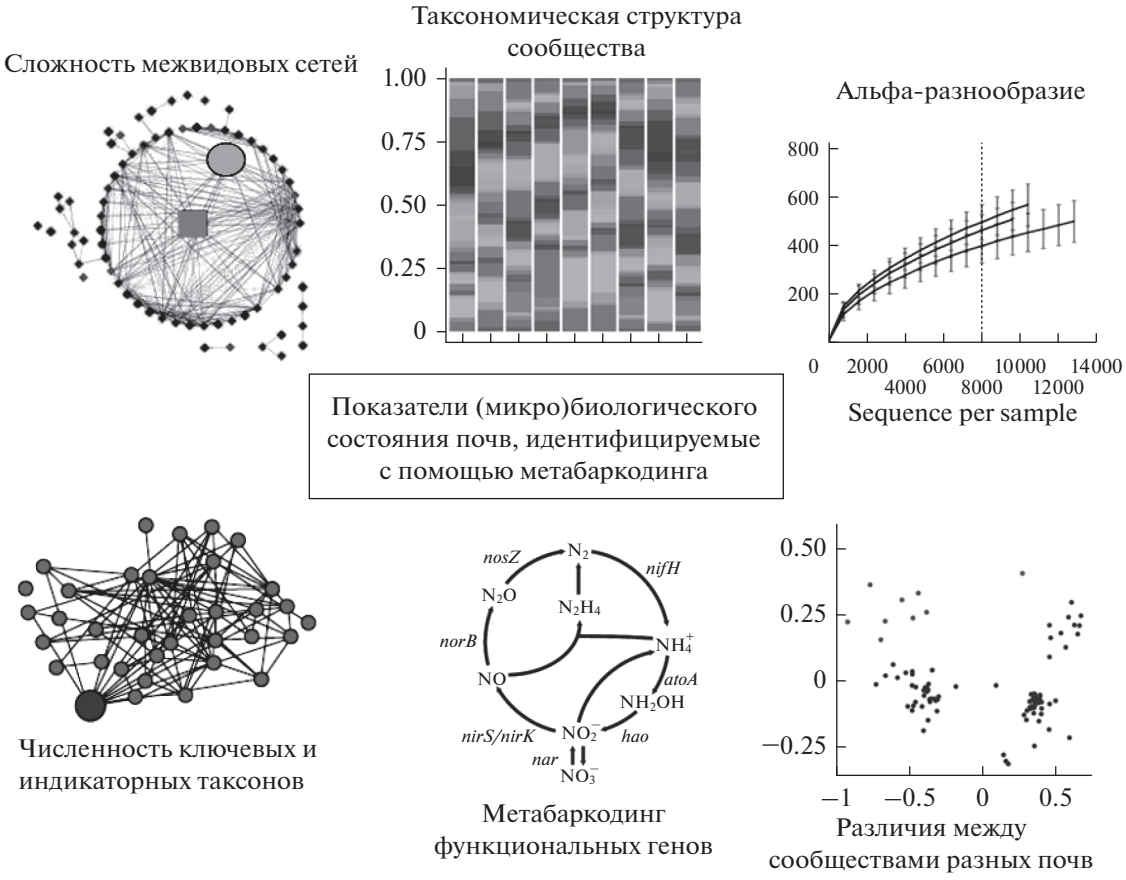

Рис. 3. Основные микробиологические показатели состояния почв, которые можно определить с помощью метабаркодинга.

сообществ, связанных с определенным процессом (метабаркодинг функциональных генов) (рис. 3). Также по результатам метабаркодинга можно выявлять корреляции отдельных таксонов или сообществ с почвенно-экологическими условиями.

Метабаркодингу принадлежит ведущая роль в изучении экологии и распространения малоисследованных таксонов микроорганизмов в почвах. Наиболее яркими примерами могут служить филумы *Thaumarchaeota* и *Verrucomicrobia*, представители которых очень трудно культивируются в лаборатории. До сих пор всего три вида таумархеот выделены в чистую культуру. При помощи количественной ПЦР и метабаркодинга было показано, что *Thaumarchaeota* являются самыми распространенными археями в почве и вообще на Земле, и, по всей видимости, они являются основными окислителями аммония (нитрификаторами) в почвах (Pester et al., 2011). По сравнению с нитрифицирующими бактериями, таумархеоты хорошо адаптированы к низким концентрациям аммония, что дает им преимущество в олиготрофных условиях среды, характерных для почв (Valentine, 2007). Доля таумархеот составляет в среднем 5–15% от всего прокариотного сообщества.

Подобно таумархеотам, подавляющее число видов веррукомикробий в настоящее время также не удалось выделить в чистую культуру. Тем не менее с помощью метабаркодинга было показано, что наряду с протео-, актино- и ацидобактериями, данный филум является одним из основных доминантов в составе прокариотных сообществ, обычно варьируя в диапазоне от 5 до 15% от всех отсеквенированных последовательностей ДНК, а в черноземах – до 25% и выше (Semenov et al., 2018b). Вопрос о факторах, ответственных за распределение *Verrucomicrobia* в почвах, до сих пор остается открытым. Долгое время считалось, что *Verrucomicrobia* – олиготрофы, способные расти в условиях низкой доступности углерода (da Rocha et al., 2010; Senechkin et al., 2010; Eilers et al., 2012). Тем не менее с помощью метабаркодинга было показано, что основная численность веррукомикробий приурочена к верхним горизонтам почв, более обеспеченным органическим веществом (Semenov et al., 2018b). Метагеномный анализ выявил связь между пространственным распределением *Verrucomicrobia* и наличием углерода (Fierer et al., 2013). Кроме того, численность веррукомикробий снижается при распашке, а также остро

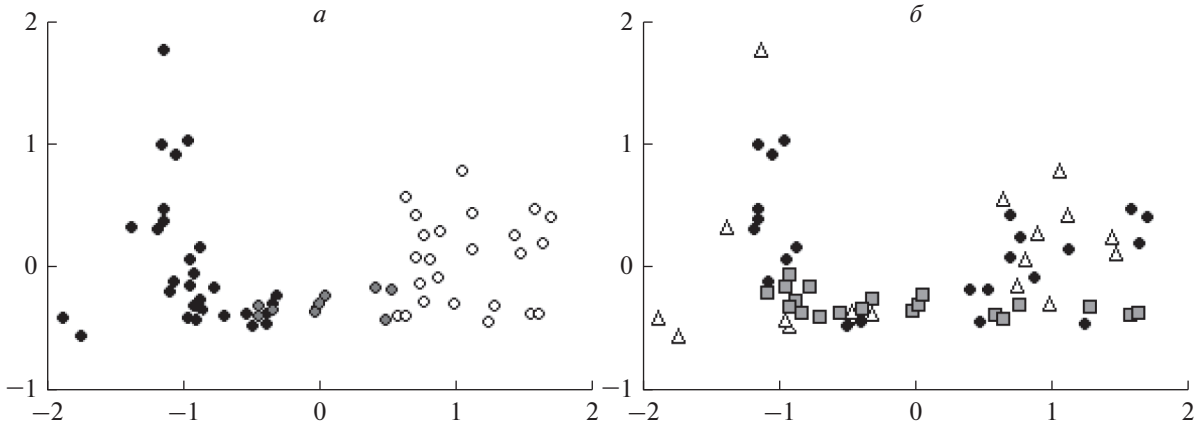

Рис. 4. Схожесть структуры прокариотных сообществ A, AB и B горизонтов черноземов лесополосы, залежи и пашни по методу Bray–Curtis. *а*: черный – горизонты A, серый – AB, белый – B. *б*: черные окружности – пашня, серые квадраты – залежь, белые треугольники – лес (по: Semenov et al., 2018b).

реагирует на снижение содержания органического вещества почвы (Navarrete et al., 2015; Semenov et al., 2018b).

Метабаркодинг считается наиболее эффективным способом выявления ключевых таксонов (Banerjee et al., 2018). Ключевые таксоны отличаются сравнительно высокой долей в составе сообщества, определяют его структуру и имеют большое количество связей в межвидовых сетях. Примерами ключевых бактериальных таксонов служат порядки *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, *Clostridiales*, *Actinomycetales*, *Acidobacteria* GP4 и *Rhizobiales* (Banerjee et al., 2018).

Главным преимуществом метабаркодинга является возможность анализировать сообщества целиком: их разнообразие, сложность межвидовых сетей и степень различий между разными сообществами. Микробные сообщества значительно различаются в зависимости от глубины и типа генетического горизонта почвы, кластеризуясь на сообщества A, AB и B горизонтов (Will et al., 2010; Semenov et al., 2018b); различия по типу землепользования при этом оказываются значительно ниже (рис. 4). Динамика структуры почвенных микробиомов может быть связана с активностью почвенных процессов. Например, вызванная атмосферными осадками пульсирующая динамика выделения углекислого газа является реакцией определенных микробных групп на увлажнение (Placella et al., 2012). Микробные сообщества почв сильно реагируют на агрогенные воздействия, такие как внесение удобрений (Chen et al., 2016; Bom et al., 2018). Использование азотных удобрений увеличивает численность копиотрофов (*Proteobacteria* и *Firmicutes*) и уменьшает долю олиготрофов (*Acidobacteria*, *Nitrospirae* и *Chloroflexi*). Особенно сильно негативное влияние проявляется на порядок *Rhizobiales*, включающий в себя множество ассоциативных азотфиксаторов. Внесение фосфорных удобрений повышает численность *Armatimonadetes* и *Chlorobi* (Ling et al., 2017).

Данные по составу и относительной численности таксонов в сообществе, полученные с помощью метабаркодинга, могут быть использованы для построения межвидовых сетей (Barberan et al., 2012). Сложность межвидовых сетей может служить экологическим индикатором функционирования и устойчивости микробных сообществ в почве, ризосфере и других локусах. На основе результатов метабаркодинга показано, что межвидовые сети в ризосфере по сравнению с почвой менее сложны, но более устойчивы, а таксоны сильнее ассоциированы друг с другом (Fan et al., 2018). Сложность межвидовых сетей также может быть использована при диагностике антропогенных нарушений (Ding et al., 2015). Во вторичных лесах после вырубки, по сравнению с первичными, происходит упрощение межвидовых сетей, а также замещение основных медиаторов внутри сетей (Tian et al., 2018). Интенсификация сельского хозяйства и применение традиционной системы земледелия на базе средств химизации нарушает структуру межвидовых сетей в почве, сокращает ее сложность, а также уменьшает численность ключевых таксонов. Органическая система земледелия, наоборот, помогает восстанавливать сложность межвидовых сетей в почве (Banerjee et al., 2019).

Произведена попытка картографирования пространственного распределения почвенных микробных сообществ (Terrat et al., 2017; Karimi et al., 2018). Для этого были отобраны и проанализированы 2173 образцов почв на территории Франции. В результате были построены карты видового богатства, микробного разнообразия и распространения отдельных таксонов. В данной работе авторам

удалось показать роль разных почвенно-экологических факторов в формировании структуры почвенных микробиомов, среди которых наиболее значимыми оказались pH, тип землепользования и гранулометрический состав (Karimi et al., 2018). Данный подход очень полезен с точки зрения изучения биогеографии почвенных микробных сообществ, однако остается открытым вопрос, какие именно микробиологические показатели состояния почв следует картографировать.

Таким образом, несмотря на ограничения в предсказании активности и характера процессов в почве, метабаркодинг и метагеномика становятся обязательной частью любых исследований в рамках экологии почвенной биоты. В отличие от часто и быстро изменяющихся во времени показателей (ферментативной активности или микробного дыхания), структура микробных сообществ и метагеном в отсутствие нарушающих воздействий сравнительно постоянны во времени и описывают потенциальные возможности сообщества, очерчивая верхнюю и нижнюю границы их потенциальной активности. Тем не менее в настоящее время ДНК-методы наиболее распространены в почвенной микробиологии и позволяют генерировать новые научные гипотезы, которые впоследствии должны быть дополнены классическими анализами определения микробной активности.

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТАГЕНОМИКИ И МЕТАБАРКОДИНГА В ПОЧВЕННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В техническом плане для повышения качества и точности ампликонного и метагеномного анализа необходимо увеличение прочитываемой длины фрагмента, что позволит собирать более длинные контиги или охватывать более длинные маркерные участки. Примером может служить новая технология нанопорового секвенирования, с помощью которой можно очень быстро получать сверхдлинные прочтения ДНК. Использующие данную технологию секвенаторы MinION по размеру идентичны карте памяти и позволяют получать данные в полевых условиях сразу после отбора образцов. Большое количество ошибок в прочтениях накладывает ограничения на использование текущей версии MinION для метагеномики и метабаркодинга, однако в ближайшем будущем с развитием нанопорового секвенирования данный метод будет активно применяться при изучении почвенной ДНК.

Хотя использование ампликонного и метагеномного секвенирования почвенной ДНК началось около 15 лет назад, научные представления о генетической информации в почве по-прежнему очень ограничены. Основные результаты были получены лишь для пула прокариот, тогда как разнообразие эукариот в почве остается практически неизученным. Хотя на долю эукариот приходится не более 1% генов (Delmont et al., 2012), во многих почвах более половины микробной биомассы представлена грибами (Bailey et al., 2002; Семенов и др., 2013). Одним из наиболее активных направлений применения метабаркодинга в ближайшее время станет интенсивное исследование почвенных эукариот – грибов, водорослей, простейших и фауны. В то же время, несмотря на обилие работ по анализу маркерного гена 16S рРНК, до сих пор не очень понятно, как функционируют даже бактериальные сообщества в почве. Анализ почвенной ДНК неминуемо упирается в свою ограниченную применимость, которая заключается в трудности выделения живых и метаболически активных организмов из общего пула. В связи с этим метагеномика и метагенетика, отражающие потенциал сообщества, должны быть дополнены методами, которые способны выражать его потенциальную и реальную активность. Прежде всего, ДНК-подходы можно дополнить применением РНК-метабаркодинга (Hirsch et al., 2009; Baldrian et al., 2012) и метатранскриптомики (RNA-seq) (Tveit et al., 2014; Hesse et al., 2015; Zifcakova et al., 2017), с помощью которых происходит анализ только живых организмов – активных и потенциально активных. Такой подход решает проблему внеклеточной ДНК, мертвых и покоящихся клеток, а получившиеся данные гораздо легче связать непосредственно с активностью процессов, протекающих в почве. Также для изучения связи между структурой сообществ и экосистемными функциями применяется комбинирование метабаркодинга и анализа стабильных изотопов (прежде всего, ^{13}C и ^{18}O) – DNA-SIP (Bernard et al., 2007). Данный метод позволяет определять разнообразие микробных популяций, активно ассимилирующих углерод из поступающих растительных остатков, а также изучать трофические предпочтения и экологические стратегии разных групп микроорганизмов в почве.

Еще одной возможностью является применение двух других “мета-омиксных” подходов – метапротеомики (анализ пула белков) и метаболомики (анализ пула метаболитов). Если в случае РНК-анализа мы не всегда можем сказать, какие из транскриптов генов активны и транслируются, а какие – нет, то белки являются продуктом трансляции и более надежным биомаркером того или иного процесса (Bouchez et al., 2016). Кроме того, метапротеомика позволяет оценивать таксономическую структуру обитающих в почве прокариотных и эукариотных сообществ. Комбинация всех четырех методических подходов может показать всю цепочку событий: как потенциал (ДНК) переходит в активность (РНК и белки), а активность отражается на характере и направленности экоси-

стемных процессов (метаболиты). Конечным звеном и результатом данной цепи являются классические почвенные параметры, описывающие функции совокупной почвенной биоты: дыхание, ферментативную активность, минерализацию, эффективность использования углерода и пр. Понимание работы каждого элемента цепи и связей между ними является одной из конечных целей мета-подходов, среди которых метагеномике отводится роль первого из них.

Отдельно необходимо упомянуть, что на сегодняшний день существует недостаток (микро)биологических показателей плодородия и экологического состояния почв, необходимых для оценки и мониторинга почвенных ресурсов. Именно метагеномика и метабаркодинг считаются наиболее перспективными направлениями по выявлению таких показателей – биоразнообразия, численности индикаторных таксонов и сложности межвидовых связей.

Данная работа подготовлена при поддержке РФФИ, проект № 19-04-00315. Автор выражает благодарность академику РАН В.В. Рожнову и О.Л. Макаровой за предоставленную возможность представления материала на XXV Сукачевских чтениях “Метагеномика и метабаркодинг в экологических исследованиях: методический прорыв?!”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Благодатская Е.В., Семенов М.В., Якушев А.В., 2016. Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. М.: Т-во науч. изд. КМК. 243 с.

Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М., 2005. Биология почв. М.: Изд-во МГУ. 440 с.

Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики, 2004. Под ред. Першиной Е.В., Кутовой О.В., Когута Б.М., Андронова Е.Е. СПб.: Информ-Навигатор. 288 с.

Семенов М.В., Стольникова Е.В., Ананьева Н.Д., Иващенко К.В., 2013. Структура микробного сообщества почвы катены правобережья р. Оки // Изв. РАН. Сер. биол. № 3. С. 299–308.

Abia A.L.K., Alisoltani A., Ubomba-Jaswa E., Dippenaar M.A., 2019. Microbial life beyond the grave: 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of bacteria diversity and their functional profiles in cemetery environments // Sci. Total Environ. V. 655. P. 831–841.

Angly F.E., Dennis P.G., Skarshewski A., Vanwonterghem I., Hugenholtz P., Tyson G.W., 2014. CopyRighter: A rapid tool for improving the accuracy of microbial community profiles through lineage-specific gene copy number correction // Microbiome. V. 2. P. 11.

Bailey V.L., Smith J.L., Bolton H., Jr, 2002. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration // Soil Biol. Biochem. V. 34. № 7. P. 997–1007.

Bakker P.A., Berendsen R.L., Doornbos R.F., Wintermans P.C., Pieterse C.M., 2013. The rhizosphere revisited: Root microbiomics // Front. Plant Sci. V. 4. P. 165.

Baldrian P., 2019. The known and the unknown in soil microbial ecology // FEMS Microbiol. Ecol. V. 95. № 2. P. fiz005.

Baldrian P., Kolarik M., Stursova M., Kopecky J., Valaskova V. et al., 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition // ISME J. V. 6. № 2. P. 248–258.

Balvociute M., Huson D.H., 2017. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT – how do these taxonomies compare? // BMC Genom. V. 18. № 2. P. 114.

Banerjee S., Schlaeppi K., Heijden M.G., 2018. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning // Nat. Rev. Microbiol. V. 16. P. 567–576.

Banerjee S., Walder F., Buchi L., Meyer M., Held A.Y. et al., 2019. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots // ISME J. V. 13. P. 1722–1736.

Barberan A., Bates S.T., Casamayor E.O., Fierer N., 2012. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities // ISME J. V. 6. № 2. P. 343–351.

Bardgett R.D., Bowman W.D., Kaufmann R., Schmidt S.K., 2005. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology // Trends Ecol. Evol. V. 20. № 11. P. 634–641.

Bernard L., Mougel C., Maron P.A., Nowak V., Lévêque J. et al., 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ^{13}C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques // Environ. Microbiol. V. 9. № 3. P. 752–764.

Blagodatskaya E., Kuzyakov Y., 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches // Soil Biol. Biochem. V. 67. P. 192–211.

Bohan D.A., Vacher C., Tamaddoni-Nezhad A., Raybould A., Dumbrell A.J., Woodward G., 2017. Next-generation global biomonitoring: Large-scale, automated reconstruction of ecological networks // Trends Ecol. Evol. V. 32. № 7. P. 477–487.

Bom F., van der, Nunes I., Raymond N.S., Hansen V., Bonnichsen L. et al., 2018. Long-term fertilisation form, level and duration affect the diversity, structure and functioning of soil microbial communities in the field // Soil Biol. Biochem. V. 122. P. 91–103.

Bouchez T., Blieux A.L., Dequiedt S., Domaizon I., Dufresne A. et al., 2016. Molecular microbiology methods for environmental diagnosis // Environ. Chem. Lett. V. 14. № 4. P. 423–441.

Callahan B.J., McMurdie P.J., Holme S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis // ISME J. V. 11. № 12. P. 2639–2943.

Carini P., Marsden P.J., Leff J.W., Morgan E.E., Strickland M.S., Fierer N., 2017. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity // Nat. Microbiol. V. 2. P. 16242.

Carugati L., Corinaldesi C., Dell'Anno A., Danovaro R., 2015. Metagenetic tools for the census of marine meio-

faunal biodiversity: An overview // Mar. Genomics. V. 24. P. 11–20.

Chen C., Zhang J., Lu M., Qin C., Chen Y. et al., 2016. Microbial communities of an arable soil treated for 8 years with organic and inorganic fertilizers // Biol. Fert. Soils. V. 52. № 4. P. 455–467.

Coissac E., Riaz T., Puillandre N., 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals // Mol. Ecol. V. 21. № 8. P. 1834–1847.

D'Amore R., Ijaz U.Z., Schirmer M., Kenny J.G., Gregory R. et al., 2016. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling // BMC Genom. V. 17. P. 55.

da Rocha U.N., Andreote F.D., Azevedo J.L., de, Elsas J.D., van, Overbeek L.S., van, 2010. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the Verrucomicrobia subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere // J. Soils Sediments. V. 10. № 2. P. 326–339.

Delmont T.O., Prestat E., Keegan K.P., Faubladier M., Robe P. et al., 2012. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome // ISME J. V. 6. № 9. P. 1677–1687.

Ding J., Zhang Y., Deng Y., Cong J., Lu H. et al., 2015. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline // Sci. Rep. V. 5. P. 7994.

Eilers K.G., Debenport S., Anderson S., Fierer N., 2012. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil // Soil Biol. Biochem. V. 50. P. 58–65.

Esposito A., Kirschberg M., 2014. How many 16S-based studies should be included in a metagenomic conference? It may be a matter of etymology // FEMS Microbiol. Let. V. 351. № 2. P. 145–146.

Fan K., Weisenhorn P., Gilbert J.A., Chu H., 2018. Wheat rhizosphere harbors a less complex and more stable microbial co-occurrence pattern than bulk soil // Soil Biol. Biochem. V. 125. P. 251–260.

Fierer N., Leff J.W., Adams B.J., Nielsen U.N., Bates S.T. et al., 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes // PNAS. V. 109. № 52. P. 21390–21395.

Fierer N., Ladau J., Clemente J.C., Leff J.W., Owens S.M. et al., 2013. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States // Science. V. 342. № 6154. P. 621–624.

Fonseca V.G., Nichols B., Lallias D., Quince C., Carvalho G.R. et al., 2012. Sample richness and genetic diversity as drivers of chimera formation in nSSU metagenetic analyses // Nucleic Acids Res. 40. № 9. P. e66.

Geisen S., Laros I., Vizcaino A., Bonkowski M., Groot G.A., de, 2015. Not all are free-living: High-throughput DNA metabarcoding reveals a diverse community of protists parasitizing soil metazoan // Mol. Ecol. V. 24. № 17. P. 4556–4569.

Gorbacheva M.A., Melnikova N.V., Chechetkin V.R., Kravatsky Y.V., Tchurikov N.A., 2018. DNA sequencing and metagenomics of cultivated and uncultivated chernozems in Russia // Geoderma Regional. V. 14. P. e00180.

Grundmann G.L., 2004. Spatial scales of soil bacterial diversity – the size of a clone // FEMS Microbiol. Ecol. V. 48. № 2. P. 119–127.

Hamady M., Knight R., 2009. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges // Genome Res. V. 19. № 7. P. 1141–1152.

Handelsman J., 2009. Metagenetics: Spending our inheritance on the future // Microb. Biotechnol. V. 2. № 2. P. 138–139.

Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products // Chem. Biol. V. 5. № 10. P. 245–249.

Hesse C.N., Mueller R.C., Vuyisich M., Gallegos-Graves L.V., Gleasner C.D. et al., 2015. Forest floor community metatranscriptomes identify fungal and bacterial responses to N deposition in two maple forests // Front. Microbiol. V. 6. P. 337.

Hirsch P.R., Gilliam L.M., Sohi S.P., Williams J.K., Clark I.M., Murray P.J., 2009. Starving the soil of plant inputs for 50 years reduces abundance but not diversity of soil bacterial communities // Soil Biol. Biochem. V. 41. № 9. P. 2021–2024.

Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J. et al., 2016. A new view of the tree of life // Nat. Microbiol. V. 1. P. 16048.

Ibanez de Aldecoa A.L., Zafra O., Gonzalez-Pastor J.E., 2017. Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities // Front. Microbiol. V. 8. P. 1390.

Ji Y., Ashton L., Pedley S.M., Edwards D.P., Tang Y. et al., 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding // Ecol. Lett. V. 16. № 10. P. 1245–1257.

Kang S., Mills A.L., 2006. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure // J. Microbiol. Meth. V. 66. № 2. P. 242–250.

Karimi B., Terrat S., Dequiedt S., Saby N.P., Horrigue W. et al., 2018. Biogeography of soil bacteria and archaea across France // Sci. Adv. V. 4. № 7. P. eaat1808.

Keegan K.P., Glass E.M., Meyer F., 2016. MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function // Microbial Environmental Genomics (MEG). N.Y.: Humana Press. P. 207–233.

Knight R., Vrbanac A., Taylor B.C., Aksenov A., Callewaert C. et al., 2018. Best practices for analysing microbiomes // Nat. Rev. Microbiol. V. 16. № 7. P. 410–422.

Kuikman P.J., Elsas J.D., van, Jansen A.G., Burgers S.L., Veen J.A., van, 1990. Population dynamics and activity of bacteria and protozoa in relation to their spatial distribution in soil // Soil Biol. Biochem. V. 22. № 8. P. 1063–1073.

Kumar V., AlMomin S., Al-Aqeel H., Al-Salameen F., Nair S., Shajan A., 2018. Metagenomic analysis of rhizosphere microflora of oil-contaminated soil planted with barley and alfalfa // PloS One. V. 13. № 8. P. e0202127.

Langille M.G., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D. et al., 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // Nat. Biotechnol. V. 31. № 9. P. 814–821.

Lauber C.L., Ramirez K.S., Aanderud Z., Lennon J., Fierer N., 2013. Temporal variability in soil microbial communi-

ties across land-use types // ISME J. V. 7. № 8. P. 1641–1650.

Ling N., Chen D., Guo H., Wei J., Bai Y. et al., 2017. Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe // Geoderma. V. 292. P. 25–33.

Loeppmann S., Semenov M., Kuzyakov Y., Blagodatskaya E., 2018. Shift from dormancy to microbial growth revealed by RNA:DNA ratio // Ecol. Indic. V. 85. P. 603–612.

Lombard N., Prestat E., Elsas J.D., van, Simonet P., 2011. Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics // FEMS Microbiol. Ecol. V. 78. № 1. P. 31–49.

Lorenz P., Eck J., 2005. Metagenomics and industrial applications // Nat. Rev. Microbiol. V. 3. № 6. P. 510–516.

Louca S., Doebeli M., Parfrey L.W., 2018. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem // Microbiome. V. 6. № 1. P. 41.

Mendes L.W., Tsai S.M., Navarrete A.A., Hollander M., de, Veen J.A., van, Kuramae E.E., 2015. Soil-borne microbiome: Linking diversity to function // Microb. Ecol. V. 70. № 1. P. 255–265.

Mummey D., Holben W., Six J., Stahl P., 2006. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils // Microb. Ecol. V. 51. № 3. P. 404–411.

Murali A., Bhargava A., Wright E.S., 2018. IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences // Microbiome. V. 6. № 1. P. 140.

Navarrete A.A., Soares T., Rossetto R., Veen J.A., van, Tsai S.M., Kuramae E.E., 2015. Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility // Antonie van Leeuwenhoek. V. 108. № 3. P. 741–752.

Nesme J., Achouak W., Agathos S.N., Bailey M., Baldrian P. et al., 2016. Back to the future of soil metagenomics // Front. Microbiol. V. 7. P. 73.

Niimi H., Mori M., Tabata H., Minami H., Ueno T. et al., 2011. A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination // J. Clin. Microbiol. V. 49. № 9. P. 3316–3320.

Pester M., Schleper C., Wagner M., 2011. The Thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology // Curr. Opin. Microbiol. V. 14. № 3. P. 300–306.

Pham V.H., Kim J., 2012. Cultivation of unculturable soil bacteria // Trends Biotechnol. V. 30. № 9. P. 475–484.

Placella S.A., Brodie E.L., Firestone M.K., 2012. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups // PNAS. V. 109. № 27. P. 10931–10936.

Porazinska D.L., Giblin-Davis R.M., Esquivel A., Powers T.O., Sung W.A.Y., Thomas W.K., 2010. Ecometagenetics confirm high tropical rainforest nematode diversity // Mol. Ecol. V. 19. № 24. P. 5521–5530.

Prosser J.I., 2015. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbial ecology // Nat. Rev. Microbiol. V. 13. № 7. P. 439–446.

Ranjard L., Richaume A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil // Res. Microbiol. V. 152. № 8. P. 707–716.

Riesenfeld C.S., Schloss P.D., Handelsman J., 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities // Annu. Rev. Genet. V. 38. P. 525–552.

Rutherford P.M., Juma N.G., 1992. Influence of texture on habitable pore space and bacterial-protozoan populations in soil // Biol. Fert. Soils. V. 12. № 4. P. 221–227.

Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., Calus S.T., Cookson W.O. et al., 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses // BMC Biol. V. 12. № 1. P. 87.

Schloss P.D., Gevers D., Westcott S.L., 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies // PloS One. V. 6. № 12. P. e27310.

Schmieder R., Edwards R., 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches // Future Microbiol. V. 7. № 1. P. 73–89.

Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L. et al., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // PNAS. V. 109. № 16. P. 6241–6246.

Semenov M., Blagodatskaya E., Stepanov A., Kuzyakov Y., 2018a. DNA-based determination of soil microbial biomass in alkaline and carbonaceous soils of semi-arid climate // J. Arid Environ. V. 150. P. 54–61.

Semenov M.V., Chernov T.I., Tkhakakhova A.K., Zhelezova A.D., Ivanova E.A., Kolganova T.V., Kutovaya O.V., 2018b. Distribution of prokaryotic communities throughout the Chernozem profiles under different land uses for over a century // Appl. Soil Ecol. V. 127. P. 8–18.

Senechkin I.V., Speksnijder A.G., Semenov A.M., Bruggen A.H.C., van, Overbeek L.S., van, 2010. Isolation and partial characterization of bacterial strains on low organic carbon medium from soils fertilized with different organic amendments // Microb. Ecol. V. 60. № 4. P. 829–839.

Souza R.C., Hungria M., Cantao M.E., Vasconcelos A.T.R., Nogueira M.A., Vicente V.A., 2015. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes // Appl. Soil Ecol. V. 86. P. 106–112.

Staley J.T., Konopka A., 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // Annu. Rev. Microbiol. V. 39. P. 321–346.

Stoddard S.F., Smith B.J., Hein R., Roller B.R., Schmidt T.M., 2015. Rrn DB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development // Nucleic Acids Res. V. 43. № D1. P. D593–D598.

Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C., Willerslev E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding // Mol. Ecol. V. 21. № 8. P. 2045–2050.

Terrat S., Horrigue W., Dequietd S., Saby N.P., Lelièvre M. et al., 2017. Mapping and predictive variations of soil bacterial richness across France // PloS One. V. 12. № 10. P. e0186766.

Tian J., He N., Kong W., Deng Y., Feng K. et al., 2018. Deforestation decreases spatial turnover and alters the net-

work interactions in soil bacterial communities // Soil Biol. Biochem. V. 123. P. 80–86.

Torsvik V., Ovreas L., 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems // Curr. Opin. Microbiol. V. 5. № 3. P. 240–245.

Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria // Appl. Environ. Microbiol. V. 56. № 3. P. 782–787.

Trevors J.T., 2010. One gram of soil: A microbial biochemical gene library // Antonie Van Leeuwenhoek. V. 97. № 2. P. 99–106.

Tveit A.T., Urich T., Svenning M.M., 2014. Metatranscriptomic analysis of arctic peat soil microbiota // Appl. Environ. Microbiol. V. 80. № 18. P. 5761–5772.

Valentine D.L., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the archaea // Nat. Rev. Microbiol. V. 5. № 4. P. 316–323.

Vester J.K., Glaring M.A., Stougaard P., 2015. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments // Extremophiles. V. 19. № 1. P. 17–29.

Vetrovsky T., Baldrian P., 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses // PLoS One. V. 8. № 2. P. e57923.

Vogel T.M., Simonet P., Jansson J.K., Hirsch P.R., Tiedje J.M. et al., 2009. TerraGenome: A consortium for the sequencing of a soil metagenome // Nat. Rev. Microbiol. V. 7. P. 252.

Will C., Thürmer A., Wollherr A., Nacke H., Herold N. et al., 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes // Appl. Environ. Microbiol. V. 76. № 20. P. 6751–6759.

Wilson I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification // Appl. Environ. Microbiol. V. 63. № 10. P. 3741–3751.

Wolinska A., Kuzniar A., Zielenkiewicz U., Banach A., Blaszczyk M., 2018. Indicators of arable soils fatigue – Bacterial families and genera: A metagenomic approach // Ecol. Indic. V. 93. P. 490–500.

Wright D.A., Killham K., Glover L.A., Prosser J.I., 1993. The effect of location in soil on protozoal grazing of a genetically modified bacterial inoculum // Geoderma. V. 56. P. 633–640.

Xu J., 2016. Fungal DNA barcoding // Genome. V. 59. № 11. P. 913–932.

Zifcakova L., Vetrovsky T., Lombard V., Henrissat B., Howe A., Baldrian P., 2017. Feed in summer, rest in winter: Microbial carbon utilization in forest topsoil // Microbiome. V. 5. № 1. P. 122.

Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: Achievements, challenges, and opportunities

M. V. Semenov[a, *]

[a] *Dokuchaev Soil Science Institute*
Pyzhevskiy Lane, 7, Moscow, 119017 Russia
**e-mail: mikhail.v.semenov@gmail.com*

Modern progress in soil biology is related to the use of new molecular-biological methods based on the isolation of total DNA from soil and its further analysis. The two main approaches to the study of soil microbial DNA are metabarcoding (identification of community composition by analyzing the sequences of marker barcode genes) and metagenomics (analysis of collective genomes of the community). These two methods provide direct access to the enormous genetic diversity of the "uncultivated majority" of soil microorganisms and have become an essential part of many soil biotic studies. The review considers the application of these research methods to the study of ecology and diversity of soil microorganisms. Methodological limitations of molecular-genetic methods due to soil specificity as an object of research are discussed. Achievements, challenges, and opportunities of metabarcoding and metagenomics in soil ecology research, as well as combination of these methods with other research approaches are considered.