

## **Тема работы.**

«Поиск микроорганизмов-продуцентов протеаз и микроорганизмов, улучшающих плодородие почв»

## **Состав коллектива (на момент выполнения работы):**

*Сотрудники, непосредственно вовлечённые в анализ данных:*

Соколова Екатерина Алексеевна, ИХБФМ СО РАН, н.с., к.б.н. sokolovaea2608@yandex.ru В НГУ по совместительству веду семинары по молекулярной биологии у 2 курса ФЕН. До 14 ноября 2023 была научным сотрудником Лаборатория молекулярной генетики (ФЕН ЛабМГ), которая вела работы по проекту «Поиск микроорганизмов-продуцентов протеаз и микроорганизмов, улучшающих плодородие почв» (Шифр: 304ЕП-С1085, срок выполнения работ с 28.10.2021 по 20.12.2023).

Воронина Елена Николаевна, ИХБФМ СО РАН, с.н.с., к.б.н., зав. гр. В НГУ руководила проектом, выполняемым ФЕН ЛабМГ. В СУНЦ НГУ доцент кафедры естественных наук.

*Сотрудники ФЕН ЛабМГ:*

Воронина Е.Н., Бардашёва А.В., Емельянова Л.А., Жираковская Е.В., Каверина Г.Б., Каньшина А.В., Козлова Ю.Н., Кох Н.В., Матвеев А.Л., Мишукова О.В., Морозова В.В., Пашкова З.А., Смирнова Н.В., Соколова Е.А., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В., Тромэншлегер И.Н., Ушакова Т.А., Мирошник М.И., Хлистунов И.В., Хлусевич Е.Б., Ждид Г.

Проект «Поиск микроорганизмов-продуцентов протеаз и микроорганизмов, улучшающих плодородие почв» является блоком работ большого гранта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» (2021-2023 гг.), рук. Н.А. Кузнецов, Соглашение с Минобрнауки России № 075-15-2021-1085.

## **Финансовая поддержка.**

Проект по договору (контракту) НИОКТР «Поиск микроорганизмов-продуцентов протеаз и микроорганизмов, улучшающих плодородие почв» (Шифр: 304ЕП-С1085, срок выполнения работ с 28.10.2021 по 20.12.2023) в рамках выполнения «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» (2021-2023 гг.), рук. Н.А. Кузнецов, Соглашение с Минобрнауки России № 075-15-2021-1085

## **Научное содержание работы:**

**Постановка задачи.**

**Современное состояние проблемы (на момент начала работы).**

Почвенные микроорганизмы, стимулирующие рост растений (PGPMs), так называемые растительные пробиотики [1], играют важную роль в повышении плодородия почвы и улучшении здоровья растений благодаря их способности повышать урожайность сельскохозяйственных культур и качество питания, а также устойчивость растений к патогенам и экологические стрессы и устойчивость растений к абиотическим стрессам [2]. Микроорганизмы, стимулирующие рост растений (PGPMs), такие как микроорганизмы, солибилизирующие фосфаты, азотфиксирующие бактерии, ризобактерии PGP, штаммы биоконтроля и эндофитные бактерии, обладают способностью для стимулирования роста растений как косвенными, так и прямыми механизмами, а также сочетанием того и другого. К прямым механизмам принято относить мобилизацию малодоступных источников питательных веществ, как то, фиксацию азота, перевод соединений фосфора в растворимые формы и другие. Косвенные механизмы включают, например, борьбу с патогенами растений либо путем стимуляции защитных механизмов растения, либо путем их антагонистического подавления посредством выработки антибиотиков и сидерофоров. Тем не менее, в условиях открытого поля многочисленные биотические и абиотические ограничения могут препятствовать их эффективности и воспроизводимости, способствующим росту растений, ограничивая их успешное использование в сельском хозяйстве [3]. Реакция на инокуляцию почвы PGPM также может значительно варьироваться в зависимости от конкретного микроба, вида растения, типа почвы, плотности инокулянта и условий окружающей среды. Таким образом, одной из важных целей при создании консорциумов PGPMs является поиск наиболее эффективных и доступных микроорганизмов, а также проверка их взаимодействия с растением и почвой.

1. Woo, S.L.; Pepe, O. Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 2018, 9, 1801.
2. Vejan, P.; Abdullah, R.; Khadiran, T.; Ismail, S.; Nasrullah Boyce, A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. *Molecules* 2016, 21, 573
3. Bevivino, A. Field Microbial Application to Foster Food Quality and Safety. SIMBA Project. 2020. Available online: <http://simbaproject.eu/field-microbial-application-to-foster-food-quality-and-safety/>

### **Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.**

Исследование микроорганизмов в рамках проекта велось в трех направлениях:

1. исследование метагеномов (суммарного генома всех бактерий в образце) почв из разных мест, с целью анализа представленности и обогащенности генами разных метаболических путей, вовлечённых в механизмы стимулирования роста бактерий;
2. исследование генома индивидуальных бактерий, показавших лучшие характеристики в лабораторных тестах, с целью поиска генов, обуславливающих эти качества;
3. исследование состава микробиома (представленности бактерий разных родов, по возможности видов) образцов почвы после полевого эксперимента. Полевой эксперимент включал в себя посадку трех культур (пшеница, гречиха, кукуруза), семена которых были

обработаны консорциумами (смесями) микроорганизмов, предварительно показавших в лабораторных тестах высокие показатели стимулирования роста растений.

Все три этапа включают в себя секвенирование нового поколения (NGS) на платформе Illumina.

Направления 1 и 2 включают в себя следующие биоинформатические анализы:

1. Сборка генома de novo (\*для метагеномов может быть выполнена только на базе кластера ввиду высоких требований к ОЗУ, не менее 500 ГБ). Выполняется программой SPAdes (<https://github.com/ablab/spades>). С последующей оценкой качества программой MetaQuast (<https://quast.sourceforge.net/metaquast>).

2. Поиск открытых рамок считывания. Выполняется программой MetaGeneMark (<https://github.com/gatech-genemark/MetaGeneMark-2-exp>).

3. Предсказание генов путём анализа белковых последовательностей, предположительно получаемых с предсказанных открытых рамок считывания. Анализ заключается в сравнении последовательностей с базами данных. Выполняется программой InterProScan (<https://interproscan-docs.readthedocs.io/en/latest/>). В виду множества сравнений программа очень требовательна к ресурсам, а также к месту развертывания баз данных при локальном использовании. Использование кластера значительно облегчает процесс.

Направление 3 включает в себя биоинформатический анализ 16S рРНК микроорганизмов - определение всех микроорганизмов почве до рода или вида с последующим статистическим анализом представленности разных бактерий между образцами. Анализ выполнялся пакетом программ QIIME (<https://qiime2.org/>).

## Полученные результаты.

Суммарно было исследовано на различные типы активности, полезных для растений, 672 штамма, из них 173 были секвенированы и депонированы в коллекцию Лаборатории молекулярной генетики. Отобрано 11 штаммов (разная родовая принадлежность) с азотфиксирующей активностью, 4 штамма с фосфатмобилизирующей активностью и 2 штамма обладающих способностью продуцировать сидерофоры, из которых было составлено 20 вариантов консорциумов. (Voronina EN, et. al. Properties of potential plant growth-promoting bacterias and their effect on wheat growth promotion (*Triticum aestivum*) and soil characteristics. // *Microbiol. Res.* **2024**, *15*(1), 20-32; <https://doi.org/10.3390/microbiolres15010002> )

Полевой эксперимент включал исследование влияния 20 консорциумов на три вида растений: пшеница, кукуруза, гречиха. Схема эксперимента - предварительная инокуляция семян, с дальнейшим отслеживанием высоты растений, длины колоса, массы колосьев и массы зерна, а также содержание подвижных форм питательных элементов в почве (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O). Для гречихи, инокулированной консорциумом «*Rothia endophytic* GMG9 и *Azotobacter chroococcum* GMG39» наблюдалось системное положительное улучшение всех показателей роста и урожайности. (Sokolova EA, et. al. The effectiveness of

co-inoculation by consortia of microorganisms depends on the type of plant and the soil microbiome. // *Plants* **2024**, *13*(1), 116; <https://doi.org/10.3390/plants13010116>

### **Эффект от использования кластера в достижении целей работы.**

Использование кластера НГУ было критически важной точкой для выполнения работ по сборке геномов из данных NGS-секвенирования метагеномов образцов почвы. Особенностью этого блока работ является:

1. Большой объем входных данных (до 25 ГБ размер результата полногеномного секвенирования одного образца). Что требует большого дискового пространства для хранения файлов.
2. Сборка геномов выполняется программой metaSPAdes (metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 2017 May;27(5):824-834. doi: 10.1101/gr.213959.116. Epub 2017 Mar 15). Выполнение сборки генома производится методом графов Де Брейна. В процессе сборки собираемый геном и все анализируемые последовательности программа хранит в ОЗУ, вследствие чего для анализа требуется объем ОЗУ (до 500 ГБ). Наличие узла в кластере НГУ, который обладает 2ТБ ОЗУ позволило выполнить сборку для наиболее сложных и объемных образцов.
3. В процессе работы программы по сборке геномов генерируются объемные файлы результатов, от 100 до 200 ГБ на один образец.
4. Каждый анализ занимает значительное количество времени, а окончание работы программы может приходиться и на нерабочее время, поэтому система постоновки задач в очередь позволила сократить время между запусками, суммарно сократив время анализа.

Перечисленные выше пункты крайне затруднительно преодолеть на стандартных ПК в лаборатории, поэтому выполнение этого блока работ, начального и ключевого в анализе данных, возможно только на кластере НГУ.

### **Публикации:**

1. Voronina EN, Sokolova EA, Mishukova OV, Hlistun IV, Tromenschleger IN, Miroshnik M, Savenkov OA, Buyanova MD, Ivanov IV, Smirnova NV. Properties of potential plant growth-promoting bacterias and their effect on wheat growth promotion (*Triticum aestivum*) and soil characteristics. // *Microbiol. Res.* **2024**, *15*(1), 20-32; <https://doi.org/10.3390/microbiolres15010002>

2. Sokolova EA, Mishukova OV, Hlistun IV, Tromenschleger IN, Tikunov AY, Manakhov AD, Savenkov OA, Buyanova MD, Ivanov IV, Smirnova NV, Voronina EN. The effectiveness of co-inoculation by consortia of microorganisms depends on the type of plant and the soil microbiome. // *Plants* **2024**, *13*(1), 116; <https://doi.org/10.3390/plants13010116>

**Ваши впечатления от работы вычислительной системы и деятельности ИВЦ НГУ, а также предложения по их совершенствованию.**

Благодаря наличию ИВЦ НГУ, а во многом благодаря написанным инструкциям к нему и отзывчивому сотруднику Калюжному Владиславу Анатольевичу, нашему коллективу удалось проанализировать очень сложные образцы. В начале работы было сложно, не будучи программистом по образованию освоить, как работает комплекс: его архитектуру, особенности установки приложений, - но Владислав Анатольевич всегда приходил на помощь, давал совет, не игнорируя даже самые простые вопросы. Это было очень важно, так как пришлось иметь дело с файлами огромного размера, ранее не используемой программой, каждый запуск которой занимал много часов, поэтому ошибки в коде и остановка в работе приводили к долгому ожиданию результатов. Считаю, что отзывчивая и грамотная техподдержка является одним из ключевых факторов успешного использования ИВЦ НГУ, не менее важная, чем его технические характеристики.