

Состав и метаболический потенциал микробных сообществ пещеры Шульган-Таш: сравнение метабаркодинга и метагеномики

Полякова Е.Ю.^{1*}, Балкин А.С.^{1, 2}, Шагимарданова Е.И.¹, Кузьмина Л.А.³, Червяцова О.Я.⁴, Гоголев Ю.В.^{1, 5}, Гоголева Н.Е.^{1, 2, 6}

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

³ Уфимский институт биологии, Уфимский федеральный исследовательский центр, Российская академия наук, Уфа, Россия

⁴ Государственный природный заповедник «Шульган-Таш», Иргизлы, Россия

⁵ Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

⁶ Научно-исследовательский отдел лимнологии, Университет Инсбрука, Мондзее, Австрия

* polyakova.e.yu@gmail.com

Ключевые слова: метабаркодинг; метагеном; биопленки

Мотивация и цель: В современной микробной экологии сформировались два основных подхода для изучения микробиомов: метагеномика, основанная на полногеномном секвенировании и метабаркодирование. Принято считать, что второй подход, основанный на секвенировании отдельных таксономически значимых последовательностей уступает в релевантности моделирования метаболического потенциала сообщества в сравнении с метагеномным анализом [1]. В то же время метабаркодинг является более доступным с точки зрения финансовых и трудовых затрат, а появление новых инструментов значительно расширяет его возможности. В связи с этим, нами была поставлена задача по сравнению результатов исследований с использованием двух подходов на примере микробных сообществ пещеры Шульган-Таш. Объектом наших исследований является пещера Шульган-Таш, расположенная в предгорьях Южного Урала. Пещеры представляют собой олиготрофные экосистемы, где преобладают умеренно низкие температуры и высокая влажность воздуха, а отсутствие света накладывает ограничения на способ получения энергии. Такие экстремальные условия обитания предполагает ограниченное количество участников сообщества, что делает их удобной модельной системой.

Методы и алгоритмы: Для сравнительных исследований были выбраны настенная биопленка «Азурит» и погруженная водная биопленка из пещерного озера, которые значительно отличались друг от друга по составу и метаболическим характеристикам. Метод и результаты метабаркодинга настенной биопленки были опубликованы ранее [2]. Биоинформатический анализ данных шотган-секвенирования был выполнен по следующей схеме: удаление последовательностей адаптеров и фильтрация ридов по качеству с помощью Trimmomatic, сборка метагенома с использованием metaspades, бининг, доработка

и повторная сборка бинов в пакете metawrap. Качество Metagenome-assembled genomes (MAGs) на всех этапах проверяли с использованием checkM. Дополнительно MAGs фильтровались программой refineM. Обилие каждого MAG в метагеноме высчитывали программой CoverM. Таксономическое профилирование делали с использованием базы данных GTDB r214.

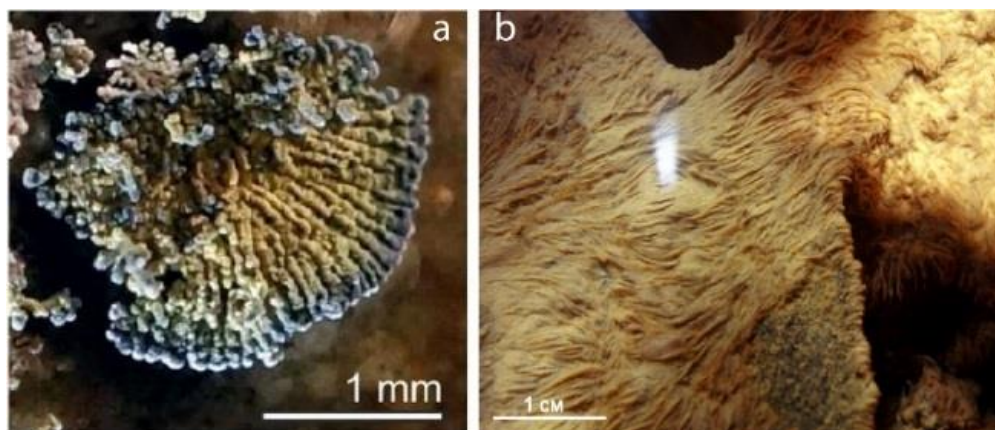


Рис. 1. Биопленки пещеры Шульган-Таш: настенное обрастание Азурит (а), погруженная водная биопленка пещерного озера «Дальнее» (b)

Результаты: Биопленка «Азурит» по данным метабаркодинга была представлена филами Actinomycetota (> 70 % сообщества) и Pseudomonadota (> 13 %), а также в меньшей степени филами Acidobacteriota (~3 %), Planctomycetota (~2.5 %), Chloroflexota (~1 %). На более низком таксономическом уровне доминировали неидентифицированный представитель семейства Pseudonocardiaceae (~62 %), некультивируемый представитель рода (MAG) Palsa-1315 (семейство Nitrospiraceae), g. Pseudonocardia, некультивируемый род (MAG) WHTC01 (семейство Egibacteraceae), неидентифицированный представитель класса Gammaproteobacteria, а также представители рода Miltoncostaea, ранее обнаруженный в морских местообитаниях.

В водной биопленке преобладали представители Pseudomonadota, Acidobacteriota, Planctomycetota, Methyloirabilota, Chloroflexota, и Nitrospirota, а также Actinomycetota, причем доля последних составляла немногим более 5 %. Наиболее представленные таксоны на уровне рода классифицировались как ранее собранные MAG, а именно Palsa-1315 (семейство Nitrospiraceae), DSQQ01 (класс Anaerolineae), AR19 (порядок Rokubacteriales), CSP1-1 (семейство Nitrosopumilaceae), 40CM-68-15 (порядок Rokubacteriales), GMQP-bins7 (семейство Gaiellaceae), QEVD01, Gp6-AA45 (порядок Vicinamibacteriales), VGXF01 (семейство Nitrospiraceae).

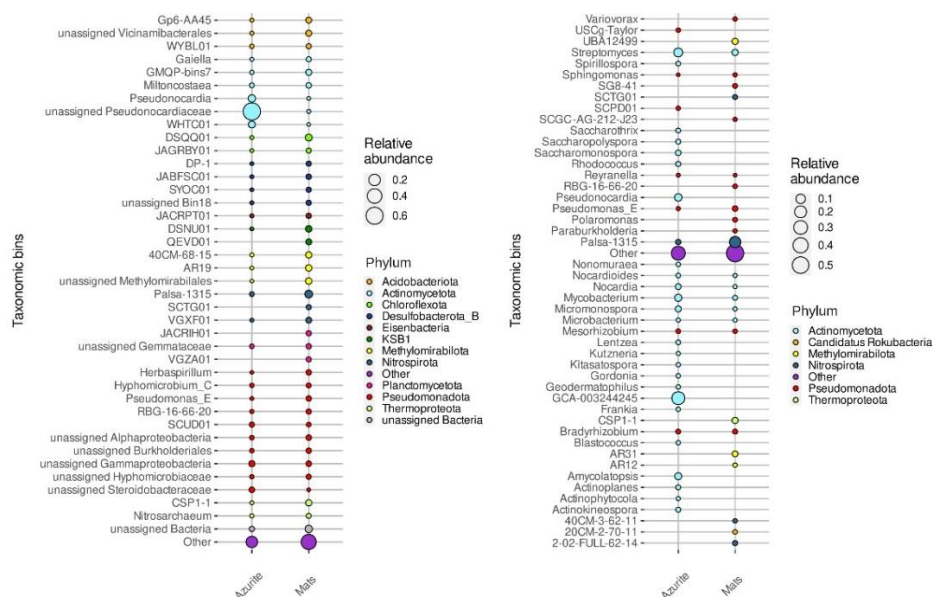


Рис. 2. Наиболее представленные роды бактерий в образцах «Азурит» и водной биопленке, выявленных с помощью 16S метабаркодинга (слева) и shotgun-секвенирования метабенома (справа). Размер круга отражает относительную численность ампликонов (ASV для данных метабаркодинга), либо покрытие ридов (для образцов shotgun) в образцах, цветом круга обозначены филоны бактерий

Результаты метагеномного анализа биопленок были сходны с результатами метабаркодинга. В настенной биопленке преобладали микроорганизмы из филоны *Actinomycetota* (более 70 % сообщества), далее филоны *Pseudomonadota* (~16 %) и *Nitrospirota* (~1 %). Доминантом, как и в метабаркодинге, оказалась некультивируемая бактерия семейства *Pseudonocardiaceae*. Далее следовали представители родов *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Mycobacterium*, *Amycolatopsis*. MAG Palsa-1315 (семейство *Nitrospiraceae*) составлял более 1 % сообщества. В водной биопленке по результатам шотган-секвенирования преобладали те же филоны, что и по результатам метабаркодинга, но доли фил незначительно отличались, а актинобактерии составляли ~14 % сообщества. MAG Palsa-1315 являлся доминантом.

Выводы: Метод метабаркодинга для быстрого и недорогого скрининга образцов являлся релевантным для биопленок олиготрофных местообитаний. Сравнение данных метабаркодинга и метагеномики демонстрировали сходные результаты на уровне доминант, но отличались по обилию минорных представителей биопленок. Значительная часть микробного сообщества не идентифицировалась до уровня рода обоими методами. Метагеномный анализ являлся предпочтительным для характеристики метаболизма микробного сообщества.

Финансирование: Исследование поддержано Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Работа поддержана грантом РНФ 22-14-00317.

Microbial community diversity and metabolic potential in the Shulgan-Tash Cave: insights from metabarcoding and metagenomics

Polyakova E.^{1*}, Balkin A.^{1,2}, Shagimardanova E.¹, Kuzmina L.³, Chervyatsova O.⁴, Gogolev Y.^{1,5}, Gogoleva N.^{1,2,6}

¹ Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

³ Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

⁴ State Nature Reserve "Shulgan-Tash", Irtyzly, Russia

⁵ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, Russia

⁶ Research Department for Limnology, Mondsee, Universität Innsbruck, Mondsee, Austria

Key words: metabarcoding; metagenome; biofilm

Motivation and Aim: In modern microbial ecology, two main approaches for studying microbiomes have emerged: metagenomics, based on whole-genome sequencing, and metabarcoding. It is generally believed that metabarcoding, which involves sequencing individual taxonomically significant sequences, is inferior to metagenomic analysis in modeling a community's metabolic potential. However, metabarcoding is more accessible in terms of financial and labor costs, and the emergence of new tools significantly expands its capabilities. In this context, we aimed to compare the results of studies using these two approaches by examining the microbial communities of Shulgan-Tash Cave, located in the foothills of the Southern Urals. Caves are oligotrophic ecosystems characterized by moderately low temperatures, high humidity, and the absence of light, which imposes restrictions on energy production. These extreme habitat conditions result in a limited number of community members, making caves a convenient model system.

Methods and Algorithms: For our comparative studies, we selected two biofilms: an azurite wall biofilm and a submerged aquatic biofilm from a cave lake, which differed significantly in composition and metabolic characteristics. Previous research has published the metabarcoding results of the wall biofilm [1]. For metagenomic analysis, we used a comprehensive bioinformatics pipeline: removal of adapter sequences and quality filtering with Trimmomatic, metagenome assembly with metaSPAdes, binning, refining, and re-assembly of bins using the MetaWRAP package. The quality of metagenome-assembled genomes (MAGs) was checked using CheckM, and MAGs were further refined with RefineM. The abundance of each MAG in the metagenome was calculated with CoverM, and taxonomic profiling was conducted using the GTDB r214 database.

Results: Metabarcoding data indicated that the azurite biofilm was predominantly composed of Actinomycetota (> 70 % of the community) and Pseudomonadota (> 13 %), with smaller contributions from Acidobacteriota (~3 %), Planctomycetota (~2.5 %), and Chloroflexota (~1 %). The dominant taxa included an unidentified representative of the family Pseudonocardiaceae (~62 %), the uncultivated genus Palsa-1315 (family Nitrospiraceae), Pseudonocardia, WHTC01 (family Egibacteraceae), an unidentified

member of the class Gammaproteobacteria, and members of the genus *Miltoncostaea*, previously found in marine habitats. The aquatic biofilm was dominated by Pseudomonadota, Acidobacteriota, Planctomycetota, Methyloirabilota, Chloroflexota, and Nitrospirota, with Actinomycetota accounting for just over 5 % of the total. The most represented genera included Palsa-1315 (family Nitrospiraceae), DSQQ01 (class Anaerolineae), AR19 (order Rokubacteriales), CSP1-1 (family Nitrosopumilaceae), 40CM-68-15 (order Rokubacteriales), GMQP-bins7 (family Gaiellaceae), QEVD01, and Gp6-AA45 (order Vicinamibacterales).

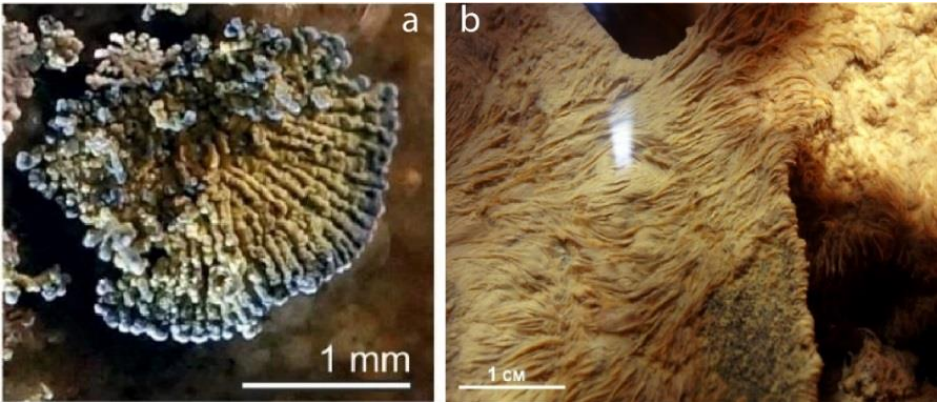


Fig. 1. Biofilms of Shulgan-Tash cave: azurite wall biofilm (a), submerged aquatic biofilm from a cave lake (b)

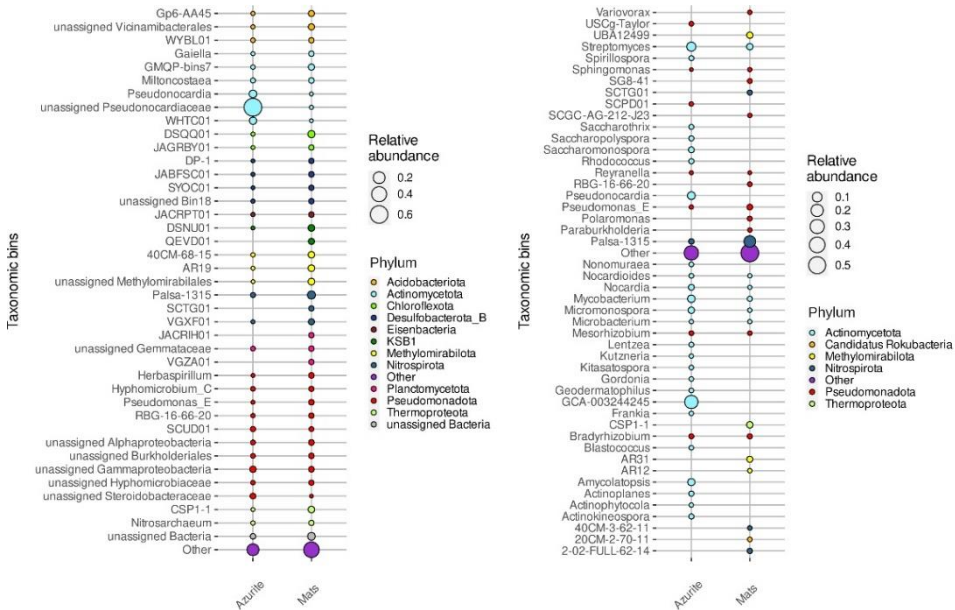


Fig. 2. The most represented bacterial genera in azurite and aquatic biofilm samples identified by 16S metabarcoding (left) and shotgun sequencing (right). The size of the circle reflects the relative abundance of amplicons (ASV for metabarcoding data) or read coverage (for shotgun samples) in the samples; the color of the circle indicates bacterial phyla

The results of metagenomic analysis were consistent with those of metabarcoding. The wall biofilm was dominated by Actinomycetota (> 70 % of the community), followed by Pseudomonadota (~16 %) and Nitrospirota (~1 %). The dominant bacterium was an uncultivated member of the family Pseudonocardiaceae, followed by representatives of the genera Streptomyces, Pseudonocardia, Mycobacterium, and Amycolatopsis. The MAG Palsa-1315 (family Nitrospiraceae) accounted for more than 1 % of the community. The aquatic biofilm also showed similar dominant phyla as the metabarcoding results, with slight differences in proportions and Actinobacteria comprising ~14 % of the community. MAG Palsa-1315 was the dominant species.

Conclusion: The metabarcoding method for rapid and inexpensive screening of samples was relevant for biofilms in oligotrophic habitats. Comparison of metabarcoding and metagenomics data showed similar results at the level of dominant taxa but differed in the abundance of minor representatives of biofilms. The correspondence between metabarcoding and metagenome data depended on the database used. A significant portion of the microbial community was not identified to the genus level by either method. Metagenomic analysis has been preferred for characterizing microbial community metabolism.

Funding: The study is supported by Kazan Federal University (PRIORITY-2030) and by RSF project ID: 22-14-00317.

Список литературы/References

1. Rieder J., Kapopoulou A., Bank C. et al. Metagenomics and metabarcoding experimental choices and their impact on microbial community characterization in freshwater recirculating aquaculture systems. *Environ Microbiome*. 2023;18(1):8. doi 10.1186/s40793-023-00459-z
2. Gogoleva N., Chervyatsova O., Balkin A. et al. Microbial tapestry of the Shulgan-Tash cave (Southern Ural, Russia): influences of environmental factors on the taxonomic composition of the cave biofilms. *Environ Microbiome*. 2023;18(1):82. doi 10.1186/s40793-023-00538-1