

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИРКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИНЦ СО РАН)

УДК 574.5+004.5

№ госрегистрации: АААА-А17-117041250054-8

Инв. № 2017-01

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИНЦ СО РАН д.м.н.

_____ К.А. Апарцин

«_____» декабря 2018 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРОРЫВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
КАК ОСНОВА ОПЕРЕЖАЮЩЕГО РАЗВИТИЯ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА
И ЕГО МЕЖРЕГИОНАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ

(0341-2016-0001)

(промежуточный)

Направление 4 - Научное обоснование охраны озера Байкал и социально-
экономического развития Байкальской природной территории

Часть 4.2

Применение методов NGS-BD (Next Generation Sequencing – Big Data)
для решения вопросов экологии (часть 2)

Руководитель темы
академик РАН

И.В. Бычков

Иркутск 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководители НИР, д.б.н., проф., зав. отделом	_____	Е. В. Лихошвай (введение, разделы 4, 6-8, заключение)
	подпись, дата	
д.б.н., зав. лаб.	_____	Т. И. Земская (введение, разделы 3, 5, заклучение)
	подпись, дата	
Исполнители:		
с.н.с.	_____	Ю. П. Галачъянц (разделы 6, 7)
	подпись, дата	
с.н.с.	_____	Ю. Р. Захарова (разделы 4, 6, 7)
	подпись, дата	
с.н.с.	_____	Д. П. Петрова (разделы 4, 6, 7)
	подпись, дата	
с.н.с.	_____	А. В. Ломакина (разделы 5)
	подпись, дата	
с.н.с.	_____	Ю. С. Букин (разделы 3, 6, 7)
	подпись, дата	
с.н.с.	_____	Е. А. Черкашин (разделы 1-3)
	подпись, дата	
в.н.с.	_____	А. О. Шигаров (разделы 1, 2)
	подпись, дата	
с.н.с.	_____	С. М. Шишлянников (раздел 5)
	подпись, дата	
н.с.	_____	И. С. Михайлов (разделы 3, 4, 6, 7)
	подпись, дата	
н.с.	_____	Ф. С. Малков (разделы 1, 2)
	подпись, дата	
Нормоконтролер	_____	О. М. Чагина
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 70 с., 7 разделов, 35 рис., 9 таблиц, 34 источника, 3 прил.

Применение методов NGS-BD (Next Generation Sequencing – Big Data)

для решения вопросов экологии

Перечень ключевых слов: большой объем данных, информационные технологии и системы, экоинформатика, водные экосистемы, NGS, микробиом, динамическая система.

Объект исследования и разработки: большие данные, секвенирования нового поколения (NGS), микробиом оз. Байкал, экосистема.

Цель всего блока проекта – характеристика микробиома оз. Байкал на основе методов секвенирования нового поколения (NGS) и результатов обработки полученной информации аналитическими технологиями Больших Данных (Big Data) для решения задач экологии. *Цель исследования 2018 г.:* реализация системного подхода к исследованию оз. Байкал на основе данных NGS и современных мировых стандартов и инструментальных средств.

Методы исследования: выделение и NGS секвенирование ДНК, анализ данных NGS, построение и анализ корреляционных зависимостей между характеристиками микробиома, идентификация соответствующей динамической модели; системный анализ информационных потоков; разработка графовых моделей и структуры данных для облачного хранения.

Результаты исследования: Разработан алгоритм построения концептуальной модели взаимоотношений организмов в сообществах. Показано, что петли V2–V3 16S рРНК обладают наибольшей разрешающей способностью на уровне таксонов низшего ранга (рода, вида). NGS фрагментов генов 16S и 18S рРНК проб фотического слоя 2017 г. оз. Байкал выявил высокое богатство бактерий и микроэукариот, превосходящее полученные ранее данные; демонстрация сезонных изменений OTU (Operational Taxonomic Unit) свидетельствует о перспективности метода NGS для мониторинга. Выполнено прототипирование информационно-аналитической системы поддержки исследования микробиома оз. Байкал, включая схему представления и хранения метагеномных данных и OTU, алгоритм разбора и загрузки OTU из формата пакета программного обеспечения MOTHUR в базу метагеномных данных, веб-ориентированный RESTful интерфейс прикладного программирования для доступа к данным на основе архитектуры взаимодействия компонентов распределённого приложения в сети.

Рекомендации по внедрению результатов научных исследований и разработок будут сделаны после завершения работ.

Область применения: Полученные результаты важны при разработке методик мониторинга микробных сообществ в любых системах с применением NGS.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Управление данными информационно-аналитической системы поддержки исследования микробиома озера Байкал	8
1.1 Материалы и методы	8
1.2 Результаты	9
1.3 Краткое обсуждение	14
2 Визуальное моделирование проблемно-ориентированных пакетов	16
3 Алгоритм построения сетей взаимодействия видов в сообществах микроорганизмов на основе результатов мониторинговых экологических исследований с привлечением геномных и метабеномных данных	23
3.1 Описание алгоритма	23
3.2 Апробация алгоритма	24
4 Анализ проб фотического слоя озера Байкал 2018 г методами микроскопии и микробиологии и подготовка проб для секвенирования NGS	27
4.1 Отбор проб планктонных сообществ микроэукариот и прокариот из разных экотопов озера Байкал для метабеномного анализа	27
4.2 Микробиологический анализ	28
4.3 Микроскопический анализ состава фитопланктона	32
4.4 Оптимизация метода выделения суммарной ДНК из проб водной толщи для секвенирования библиотек ампликонов фрагментов маркерных генов 16S (прокариоты) и 18S (эукариоты) рРНК	38
4.5 Секвенирование	42
5 Реконструкция полных геномов выделенных в культуры перспективных для практического применения штаммов бактерий	43
6 Структура бактериальных сообществ фотического слоя озера Байкал в весенний, летний и осенний периоды 2017 г. по данным NGS	47
6.1 Материалы и методы	47
6.2 Результаты	47
7 Сукцессия сообществ бактерий и микроэукариот в южной котловине озера Байкал в 2017 г. по данным NGS	52
7.1 Материалы и методы	52
7.2 Результаты	53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	62
Список использованной литературы	64
ПРИЛОЖЕНИЕ А Публикации по теме проекта за 2018 год	67
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Информация о количестве статей в виде таблицы	69
ПРИЛОЖЕНИЕ В Этапы выполнения проекта	70

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в исследования структурно-функциональной организации водных экосистем методов секвенирования нового поколения (NGS) и биоинформатических методов анализа больших объемов информации («больших данных») дает наиболее полное представление о таксономическом разнообразии сообществ микроэукариот и прокариот и позволяет проводить сравнительный и корреляционный анализ [1, 2]. Например, было показано, что корреляции между отдельными бактериальными таксонами намного сильнее, чем между бактериями и эукариотами или бактериями и факторами окружающей среды [3], выявлены экологические связи морских бактерий, архей и протист [4]. На основе таких ко-ассоциативных сетей стало возможным построение динамических моделей метапопуляций, которые предсказывают изменение численности различных организмов в зависимости от изменений факторов окружающей среды [5] и позволяет получить более глубокое понимание скрытых механизмов, обеспечивающих стабильность и динамику микробных сообществ [6]. Помимо фундаментальных знаний о природе моделирование сообществ имеет важный практический аспект в биотехнологии, биоэнергетике и биоремедиации, так как позволяет целенаправленно создавать многовидовые микробные сообщества с определенными функциями и предсказанным поведением [7].

Используемое в научных исследованиях ЛИН СО РАН программное обеспечение анализа ампликонов включает в себя различные библиотеки модулей обработки последовательностей, например, Mothur, USearch, статистические пакеты и среды разработки алгоритмов многомерного статистического анализа данных, например, R (<https://www.r-project.org>). Для проведения исследований с использованием обработки и анализа метагеномных данных специалисту требуются навыки программирования (составления сценариев) в командной оболочке операционной системы (Linux, Windows), запуска пакетов в распределенной вычислительной среде и кластерных вычислительных системах, а также программирования на языках R или Python. Одним из способов расширения круга пользователей сложных прикладных пакетов – это представление структуры модулей прикладного пакета в виде визуальной модели, а также разработки средств визуального проектирования вычислительного процесса. В результате пользователи-предметники, не являющиеся специалистами в области программирования, смогут самостоятельно формировать вычислительную процедуру из визуальных блоков.

Популярным подходом к представлению вычислительного процесса, который строится в виде комбинации исполняющих модулей, выступает *программирование потоков данных (dataflow programming)*. Модули получают на вход некоторые данные, обрабатывают их и выдают на выход некоторый результат. Результаты вычислений передаются на вход других модулей. Подход развивается с 1970-х годов и имеет приложения в самых различных областях.

Подход удобен тем, что модули и сценарий их исполнения удобно задавать при помощи визуального редактора. Пользователь выбирает нужный модуль из существующего набора, добавляет его в рабочую область. Затем необходимо сцепить входы и выходы модулей (порты), обеспечив таким образом передачу информации. В результате должен получиться сетевой граф, не содержащий циклов и имеющий, как правило, один вход и один выход. На вход графа подаются данные, требующие обработки, на выход графа выдается результат, который сохраняется в файл или визуализируется при помощи соответствующих модулей.

Каждый модуль прикладного пакета Mothur получает на вход название файла и в результате работы создает новый файл. Функционирование модуля зависит от параметров, задаваемых пользователем индивидуального для каждого модуля. Разработанные программные средства позволяют представлять вычислительный процесс Mothur в виде блоков системы Rapidminer Studio, реализующих вышеупомянутый модель потоков данных. Система поддерживает возможность представления сценария в виде нового комплексного блока со своими портами ввода и вывода, а также возможность облачного хранения и исполнения сценариев, что позволяет создавать распределенные вычислительные среды. Богатый набор функций Rapidminer, а также различные сервисы, предоставляемые разработчиками, стали основной причиной выбора этой системы в качестве среды разработки информационно-вычислительных ресурсов проекта.

Для того чтобы установить и исследовать механизмы взаимодействия между видами в сообществах можно использовать корреляционный анализ. Как правило, одно и то же сообщество охарактеризовано либо в сезонной динамике, либо исследователями изучалось несколько повторных проб (образцов) из разных географических районов. Таким образом, результат работ представляет собой таблицу, характеризующую представленность определенного спектра видов в разных биологических образцах. Если имеется достаточно количество таких биологических образцов (10 и более) можно рассчитать корреляционную матрицу, отражающую взаимосвязи между видами в изучаемом сообществе. Положительные коэффициенты корреляции будут свидетельствовать о взаимном позитивном влиянии видов друг на

друга. Отрицательные значения коэффициентов корреляции будут говорить о том, что в рассматриваемой паре виды конкурируют за какой-либо общий ресурс, подавляя друг друга. Информацию из корреляционной матрицы можно представить в виде сети взаимодействий (ненаправленного графа) отражающего взаимосвязи между организмами. В свою очередь такой граф может служить шаблоном для разработки динамической модели в виде системы дифференциальных уравнений, описывающей и предсказывающей поведение численности (биомассы) видов с течением времени.

1 Управление данными информационно-аналитической системы поддержки исследования микробиома озера Байкал

Краткий результат главы. Выполнено проектирование и прототипирование информационно-аналитической системы поддержки исследования микробиома озера Байкал. Усовершенствована схема представления и хранения исследовательских метагеномных данных и OTU результатов. Реализован процесс автоматического разбора и загрузки OTU-данных, полученных в программе обработки данных высокопроизводительного секвенирования MOTHUR в базу метагеномных данных. Разработан веб-ориентированный RESTful-интерфейс прикладного программирования для доступа к данным исследования микробиома на основе архитектуры взаимодействия компонентов распределённого приложения в сети. Интерфейс обеспечивает чтение и запись данных для всех объектов текущей модели информационно-аналитической системы. Развёрнута инфраструктура проекта, включая систему совместной разработки программного обеспечения (доступна по адресу <https://git.icc.ru>), систему управления проектом (доступна по адресу <https://redmine.icc.ru>).

1.1 Материалы и методы

Проектирование и реализация объектной модели информационно-аналитической системы поддержки исследования микробиома озера Байкал выполнена на платформе разработки программного обеспечения веб-приложений DJANGO с использованием шаблона проектирования MVC (Model-View-Controller) для разделения данных приложения, пользовательского интерфейса и управляющей логики. Проектирование усовершенствованной схемы данных осуществлялось в соответствии постановкой задачи и предоставленных исследовательских данных ЛИИ СО РАН. На основе разработанной схемы подготовлено метаописание таблиц базы данных. Сформированные классы объектной модели в терминах DJANGO позволили сгенерировать SQL-скрипты (Structured Query Language) создания структуры базы данных в формате СУБД (системы управления базами данных) PostgreSQL.

Для разработки программного интерфейса созданы управляющие скрипты: (1) сериализации (serializing) объектов модели разрабатываемой информационно-аналитической системы в формате JSON (JavaScript Object Notation); (2) создания представлений для каждого сериализатора класса этой модели; (3) подключения списка URL-ссылок доступных запросов интерфейса к платформе разработки Django; (4) настройки безопасности доступа к данным с поддержкой пользовательской авторизации.

1.2 Результаты

Усовершенствована схема данных исследования микробиома озера Байкал. На рисунке 1 представлена её упрощенная модель. Выполнено разделение на следующие модули:

- Модуль RPM обеспечивает общее описание проводимых исследовательских работ, включая данные по их исполнителям, публикациям, методикам, оборудованию и расходным материалам.
- Модуль WaterLIN служит для представления специфических данных исследования микробиома озера Байкал, включая описания отбираемых проб, измеримые параметры, результаты анализа проб, изучаемые ампликоны, полученные прочтения, результаты секвенирования.
- Модуль NGS организует данные, связанные с проведением вычислений по высокопроизводительному секвенированию ДНК/РНК последовательностей исследуемых проб воды и донных осадков, включая информацию по операционным таксономическим единицам, идентификаторам таксонов, используемым таксономическим базам данных, рабочим процессам (вычислительным цепочкам) обработки последовательностей и анализа результатов, списку программ, задействованных в этих рабочих процессах.

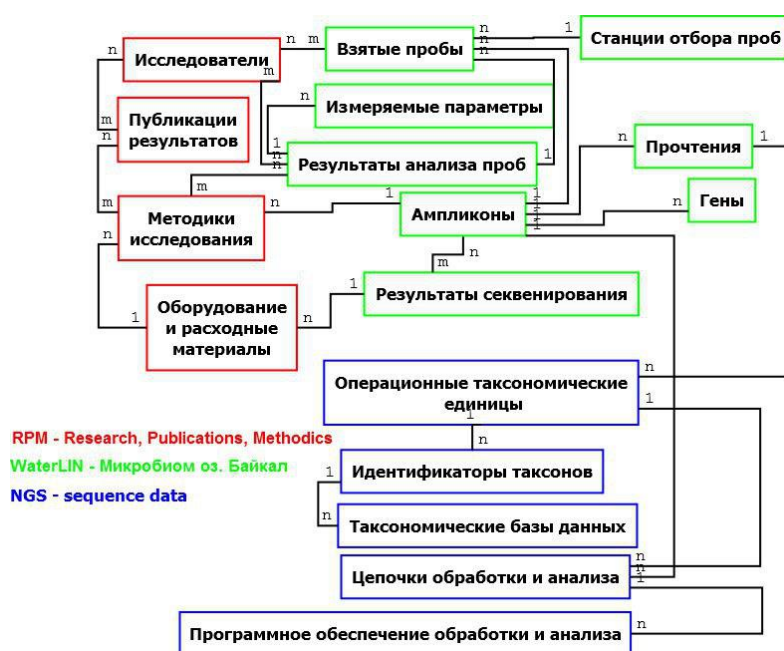


Рисунок 1 – Упрощенное представление схемы данных исследования микробиома озера Байкал

Разработан алгоритм генерации таблицы встречаемости OTU по выходным данным формата MOTHUR. На вход алгоритм получает MOTHUR файлы final.an.list и final.groups.

Исследователь выбирает необходимую частоту встречаемости, для которой необходимо посчитать OTU. На выходе алгоритм генерирует файл с необходимой таблицей встречаемости. Ниже представлены блок-схемы основных функций алгоритма (см. рисунки. 2-6). На рисунке 2 представлен алгоритм подготовки финального списка, которая из файла с множеством результатов частот встречаемости выделяет нужную строку с заданной исследователем частотой встречаемости.

```
def prepareFinalList(file_list, sequence):
    str=''
    nstr =0
    with open(file_list, 'r') as flist:
        i=0
        #разделение файла по табуляции
        for row in flist:
            t = row.strip().split('\t')
            if t[0] == sequence:
                nstr=i
                i+=1
    with open(file_list, 'r') as flist:
        #поиск необходимой строки
        for n, line in enumerate(flist):
            if n == nstr:
                str = line
    st = str.strip().split('\t')
    st.pop(0)
    st.pop(0)
    return st
```

Рисунок 2 – Программа подготовки финального списка таблицы встречаемости OTU

На рисунке 3 показан алгоритм подготовки списка по файлу final.groups, который разделяет файл на строки и столбцы для последующего удобного поиска по файлу.

```
def prepareGroupList(groupListFile):
    content = [] #пустой массив
    with open(fg, 'rb') as fag:
        for line in fag.readlines():
            #разделение строк по пробелу
            array = line.split(' ')
            first_item = array[0]
        fag.seek(0)
        #чтение CSV файла
        reader = csv.reader(fag, delimiter='\t')
        included_cols = [0,1]
        #разделение CVS файла по строкам и столбцам
        for row in reader:
            content.append(list(row[i] for i in included_cols))
    return content
```

Рисунок 3 – Программа подготовки списка группы таблицы встречаемости OTU

Рисунок 4 демонстрирует функцию получения уникальной пробы, анализирует массив данных, полученных после подготовки списка по файлу final.groups и выдает на выходе список проб, состоящий из проб по содержимому файла final.groups.

```
def getUniqueProbes (groupListArray):
    uList = []
    for gla in groupListArray:
        s = False
        for u in uList:
            if u == gla[1]:
                s=True
                break
        if s == False:
            uList.append(gla[1])
        s = False
    return uList
```

Рисунок 4 – Программа запроса уникальных проб из списка проб

На рисунке 5 представлен алгоритм поиска совпадений для заданного ампликона по данным, полученным из файла final.groups.

```
def findCompare (list_amp, list_group):
    temp = []
    for ampl in list_amp:
        for gr in list_group:
            if ampl == gr[0]:
                temp.append(gr[1])
                break
    return temp
```

Рисунок 5 – Программа поиска совпадений заданного ампликона

На рисунке 6 представлен алгоритм генерации таблицы встречаемости OTU, задающий рабочий процесс вызова функций, представленных на рисунках 2-5. Алгоритм считает количество ампликонов для каждой пробы, происходит генерация двумерной матрицы и её наполнение статистическими подсчётами, а также сериализацию результатов в файл. Спроектированный алгоритм реализован на языке программирования PYTHON. Фрагмент таблицы встречаемости OTU, полученной в результате запуска этой реализованного, показан на рисунке 7.

```

def Main():
    str = prepareFinalList(fanl, seq)
    groupList = prepareGroupList(fg)
    uniqProbe = getUniqueProbes(groupList)
    otu=[]
    for am in str:
        amp = am.split(',')
        otu.append(findCompare(amp, groupList))

    otuM = np.zeros((len(uniqProbe), len(otu)))
    otuM = otuM.astype(int)

    for ou, i in zip(otu, xrange(0, len(otu))):
        for up, j in zip(uniqProbe, xrange(0, len(uniqProbe))):
            sum = 0
            for el in ou:
                if up == el:
                    sum += 1
            otuM[j, i] = sum
    np.savetxt("otuM", otuM, delimiter=' ', fmt='%i')

```

Рисунок 6 – Блок-схема алгоритма генерации таблицы встречаемости OTU

1	479	79	72	46	54	22	18	12	8	10	7	13	6	8	7	9	4	3	8	5	5	3	3	6	7	3	2	7	5	2	
2	459	65	54	177	29	29	39	5	21	16	14	13	4	5	4	11	29	21	3	0	0	2	11	21	0	2	0				
3	266	49	34	68	66	13	53	2	28	14	26	22	0	0	3	39	31	8	4	0	0	4	7	12	3	5	0	5			
4	574	69	35	66	18	23	40	2	1	5	18	10	3	8	2	30	18	2	3	2	0	9	18	1	0	0	2	12			
5	166	72	37	35	58	11	23	9	3	33	6	15	6	7	6	3	25	25	1	0	2	5	6	7	0	3	0	2	5	2	
6	340	53	36	172	59	47	42	2	1	6	6	17	8	14	14	12	19	16	9	0	2	4	16	8	3	0	0	1			
7	607	118	65	80	38	58	27	4	24	16	10	16	9	15	5	13	18	11	6	0	2	3	14	5	2	1	0				
8	206	38	37	33	58	12	10	3	16	15	3	25	8	15	5	1	17	2	4	0	0	0	8	13	4	5	0	0	4		
9	179	19	19	6	22	18	2	0	15	23	1	18	2	31	20	3	12	0	7	0	0	3	8	6	1	1	0	3	2	0	
10	3511	1008	822	1690	1411	434	368	78	50	220	118	430	86	364	430	208	540	23													
11	438	122	78	81	83	27	30	18	3	15	32	30	7	3	5	21	29	14	9	0	2	3	12	18	1	1	0				
12	517	74	38	385	199	39	38	0	44	47	2	71	16	60	27	13	9	3	1	0	0	14	10	20	3	1					
13	465	148	75	280	62	36	50	2	2	18	17	30	10	11	28	15	34	16	5	0	2	3	14	21	0						
14	153	57	23	243	37	11	13	0	10	12	5	11	1	2	5	14	17	15	7	0	1	6	7	10	0	4	0	2			
15	535	27	26	180	130	47	49	0	12	124	5	37	8	5	5	7	19	7	3	0	1	27	1	79	0	15	0				
16	303	122	105	517	89	22	39	2	55	19	10	37	12	7	8	16	27	25	2	0	2	10	20	9	0						
17	60	7	7	276	17	3	11	1	2	11	2	2	1	5	5	3	2	0	0	0	2	2	4	0	5	0	0	2	0	0	0
18	443	56	32	95	73	38	20	3	31	17	3	28	6	23	12	9	34	29	6	0	1	5	10	25	0	3	0				
19	464	78	31	138	72	38	28	0	25	17	19	20	13	9	10	6	37	9	5	1	2	5	13	25	1	1	0				
20	646	26	30	127	111	47	7	2	5	39	4	42	13	29	5	3	60	10	4	0	0	1	25	29	0	4	0				
21	722	49	42	136	175	22	7	1	5	43	8	58	10	61	7	3	75	22	1	0	5	2	19	19	1	14	0				
22	807	151	92	167	121	45	16	4	37	23	2	36	19	43	24	3	22	19	13	0	11	9	22	15							
23	630	62	40	25	165	29	18	7	77	23	12	82	11	5	41	13	35	5	10	0	0	5	15	19	2	3					
24	224	74	21	38	46	31	22	0	21	24	4	18	3	25	7	13	26	7	4	0	1	0	7	5	0	7	0	0	4		

Рисунок 7 – Фрагмент таблицы встречаемости OTU, полученной в результате запуска реализованного алгоритма

Спроектирован и реализован программный веб-ориентированный интерфейс доступа к данным исследования микробиома озера Байкал на основе архитектуры взаимодействия компонентов распределенного приложения REST (Representational State Transfer) API. Этот интерфейс обеспечивает чтение и запись данных для всех объектов модели разрабатываемой информационно-аналитической системы. Тестовая версия интерфейса (см. рисунок 1.8) доступна по адресу <https://ngs.icc.ru/api>.

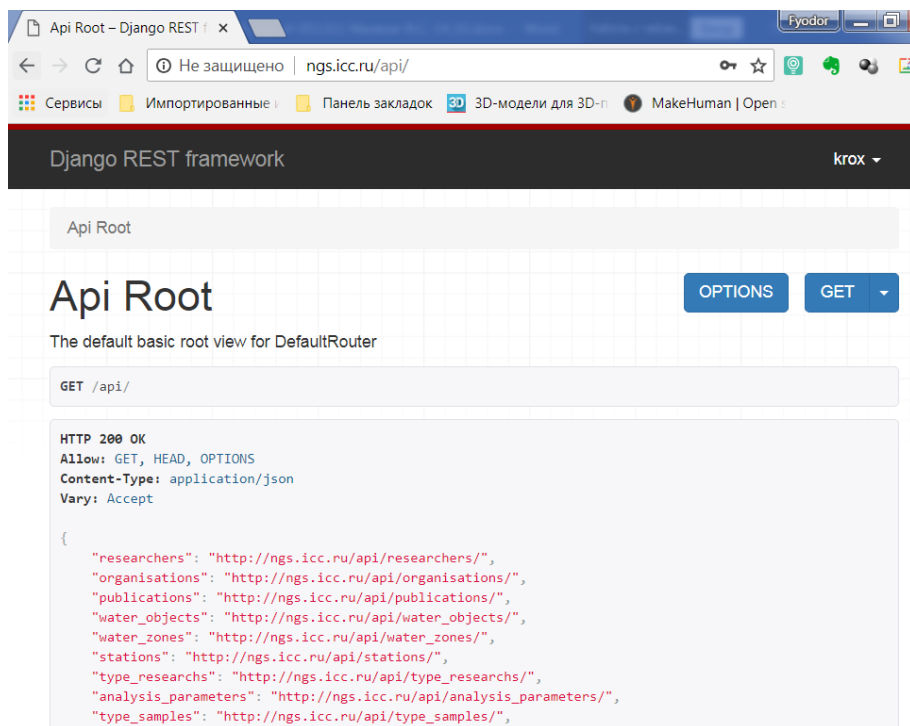


Рисунок 8 – Снимок экрана тестирования программного интерфейса (RESTful) доступа к данным исследования микробиома озера Байкал

Интерфейс определяет, что для отправки HTTP-запроса необходимо указать URL запроса, тип (POST или GET), а также данные для авторизации (имя пользователя и пароль). В ответе REST-интерфейс возвращает результат выполнения запроса в формате JSON. Пример отправки запроса для получения всех доступных URL для классов модели с использованием утилиты CURL выглядит следующим образом: `curl -X GET --user user:password http://ngs.icc.ru/api`. В результате будет получен следующий список всех доступных URL в формате JSON, как показано ниже на рисунке 9.

```
{
  "researchers": "http://127.0.0.1:8000/api/researchers/",
  "organisations": "http://127.0.0.1:8000/api/organisations/",
  "publications": "http://127.0.0.1:8000/api/publications/",
  "water_objects": "http://127.0.0.1:8000/api/water_objects/",
  "water_zones": "http://127.0.0.1:8000/api/water_zones/",
  "stations": "http://127.0.0.1:8000/api/stations/",
  "type_researchs": "http://127.0.0.1:8000/api/type_researchs/",
  "analysis_parameters": "http://127.0.0.1:8000/api/analysis_parameters/",
  "type_samples": "http://127.0.0.1:8000/api/type_samples/"
}
```

Рисунок 9 – Пример с фрагментом ответа в формате JSON с результатом выполнения запроса получения всех доступных URL ссылок интерфейса

Следующий пример показывает выполнение GET запроса для получения всех объектов класса `Researcher`, представляющего данные исполнителей исследовательских работ: `curl`

-X GET --user user:password http://ngs.icc.ru/api/researchers. В результате выполнения данного запроса будет получен список всех исследователей, как показано на рисунке 10.

```
[{"user":1,"fio":"Ivanov","organisation":1,"lab":"laboratory  
1","contacts":"890256660777","date_added":"2018-08-  
02T01:26:39.586000+08:00"}, {"user":null,"fio":"Petrov","organisation":1,"lab":null,  
"contacts":null,"date_added":"2018-12-  
07T10:43:31.039000+08:00"}, {"user":null,"fio":"Ivanov","organisation":1,"lab":null,  
"contacts":"892435556677","date_added":"2018-12-07T11:14:29.374000+08:00"}]
```

Рисунок 10 – Пример с фрагментом ответа в формате JSON с результатом выполнения запроса получения всех объектов класса Researcher.

Дополнительно к запросам чтения данных, интерфейс также предоставляет возможность изменения данных. Например, для записи данных необходимо отправить запрос POST и указать необходимые параметры объекта. Пример записи нового объекта класса Researcher: curl -X POST -d "fio=Ivanov&organisation=1&contacts=892435556677" --user user:password http://ngs.icc.ru/api/researchers, получаемым ответом, как показано на рисунке 11.

```
{"user":null,"fio":"Ivanov","organisation":1,"lab":null,"contacts":"892435556677",  
"date_added":"2018-12-07T11:14:29.374000+08:00"}
```

Рисунок 11 – Пример с фрагментом ответа в формате JSON с результатом выполнения записи нового объекта класса Researcher

1.3 Краткое обсуждение

При исследовании микробиома озера Байкал методами высокопроизводительного секвенирования порождаются большие массивы метагеномных данных. Жизненный цикл этих данных включает этапы сбора, обработки, анализа, публикации и архивирования этих. Микробиологи не всегда способны самостоятельно организовать управление жизненным циклом своих исследовательских данных. Планирование и управление данными требует навыков работы со специализированным программным обеспечением. Предполагается, что разрабатываемая информационно-аналитическая система поддержки исследования микробиома озера Байкал обеспечит микробиологов возможностью упрощенного управления метагеномными данными на протяжении всего их жизненного цикла. В частности, она позволяет микробиологам хранить и публиковать в открытом и защищенном доступе свои первичные и обработанные данные, результаты исследования, а также самостоятельно создавать и хранить соб-

ственные рабочие процессы обработки и анализа метагеномных данных при исследовании микробиома озера Байкал.

Разработаны средства управления данными (в т. ч. схема данных и объектная модель информационно-аналитической системы поддержки исследования микробиома озера Байкал, веб-ориентированный пользовательский и программный интерфейс доступа к исследовательским данным) с целью обеспечения курирования больших объемов данных высокопроизводительного секвенирования.

2 Визуальное моделирование проблемно-ориентированных пакетов

Краткий результат главы. Разработана программная система анализа исходного кода прикладного пакета Mothur, создающая абстрактную модель модулей в виде графа отношений элементов структуры пакета. Создана и формализована система знаний, при помощи которой по результатам вышеуказанного анализа осуществляется порождение исходного кода Java-модулей для системы визуального проектирования вычислительных процессов Rapidminer. В результате в Rapidminer представлены 143 процедуры обработки данных NGS. Разработанная технология позволит на следующих этапах проекта также сгенерировать визуальное представление модулей вычислительных сред NGS, таких систем, как QIIME, QIIME2, Usearch и др., что позволит унифицировать модель вычислительной процедуры анализа ампликонов и сделать ее независимой от используемого прикладного пакета.

На этапе 2018 года направлением развития автоматизации программирования сценариев метагеномного анализа являлась разработка системы интерпретации метаописаний операций программы Mothur в промежуточное представление, разработка процедуры трансформации данного представления в исходный код модулей системы Rapidminer и формирование библиотеки вычислительных модулей, которой могут пользоваться специалисты-предметники для решения биоинформатических задач.

Необходимость в автоматическом анализе исходного кода Mothur и синтезе соответствующих структур модулей Rapidminer определяется, во-первых, количеством модулей, которые необходимо представить в виде визуальных блоков, – 143, а, во-вторых, необходимостью поддерживать соответствие сгенерированных блоков новым версиям модулей Mothur, т.к. система находится в фазе активного развития. Кроме того, наличие такой модели позволяет на следующих этапах проекта разрабатывать процедуры автоматизации вычислительного процесса на кластерных вычислительных системах.

Процесс трансформации представляет собой анализ исходного кода Mothur, осуществляющийся при помощи алгоритмов, применяющих регулярные выражения для распознавания элементов структуры классов C++, задающих модули Mothur. Результаты анализа представляются в виде структур RDF (Resource description framework). Пример представления результата анализа модуля представлен на рисунке 12.


```

@prefix dc: <http://purl.org/dc/elements/1.1/> .
# .....
@prefix xsd: <http://www.w3.org/2001/XMLSchema#> .

ngsp:spec a ngsp:Specification ;
    ngsp:module mothur:chimera-ccode,
    # .....
    mothur:venn .
# .....
mothur:chimera-ccode a ngsp:Module ;
    ngsp:outputPattern [ a cnt:Chars ;
        ngsp:parameterName "type" ;
        # .....
        [ ngsp:patternString "[filename],[tag],..." ;
            dc:identifier "accnos" ],
        [ ngsp:patternString "[filename],mapinfo" ;
            dc:identifier "mapinfo" ] ;
        cnt:chars "getOutputPattern( // ... " ;
    ngsp:parameter mothur:chimera-ccode-fasta-parameter,
    # .....
    mothur:chimera-ccode-window-parameter ;
    dc:title "chimera-ccode" ;
    dct:terms:description "detect chimeric sequences" ;
    schema:citation "..."; schema:softwareHelp "...";
    nco:websiteURL <http://www.mothur.org/wiki/Chimera-ccode> ;
    v:category "Sequence Processing" .

mothur:chimera-ccode-fasta-parameter a ngsp:Parameter ;
    ngsp:important true ;
    ngsp:multipleSelectionAllowed false ;
    ngsp:optionsDefault "" ;
    ngsp:outputTypes [ a oslc:AllowedValues ;
        dc:identifier "accnos","chimera","mapinfo" ] ;
    ngsp:outputTypesOrig "chimera-mapinfo-accnos" ;
    ngsp:required true ; ngsp:type mothur:InputTypes ;
    dc:title "fasta" ; schema:sku 1 .

```

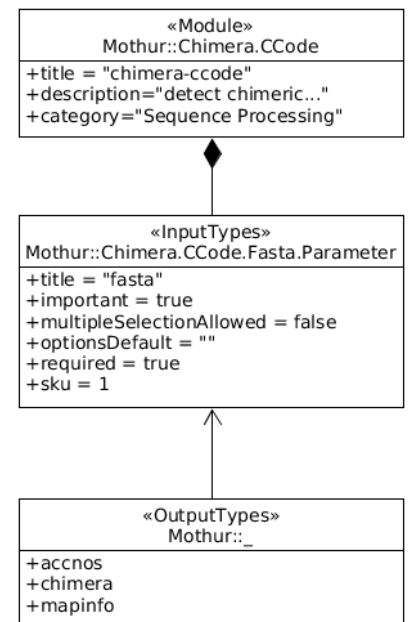


Рисунок 12 – Результат анализа класса в исходном коде прикладного пакета Mothur: представление в виде RDF (слева), диаграмма SysML (справа)

Трансформация RDF-представления производится алгоритмами, реализованными в логической и объектно-ориентированной парадигмах программирования. Для обеспечения трансформации развит предложенный ранее подход применения логического программирования в качестве языка реализации процедур трансформации моделей (знаний о трансформации) в рамках «Модельно-управляемой архитектуры» (MDA, Model driven architecture). Используемая реализация трансформации в виде программы на языке LogTalk расширена новыми объектами, представляющими собой знания о программной целевой платформе, системы программирования Java.

Трансформация представляется как сценарий синтеза платформозависимой модели (PSM) программного обеспечения (ПО) (рисунок 13). Сценарий представляет собой объект – инкапсуляцию процедур трансформации, посылающий запросы объектам, представляющим платформонезависимую модель (PIM), и управляющий объектами, синтезирующими структуру PSM. PIM представлена в виде RDF-графа (рисунок 13, а), а PIM – древовидная система блоков кода (объектов и литералов).

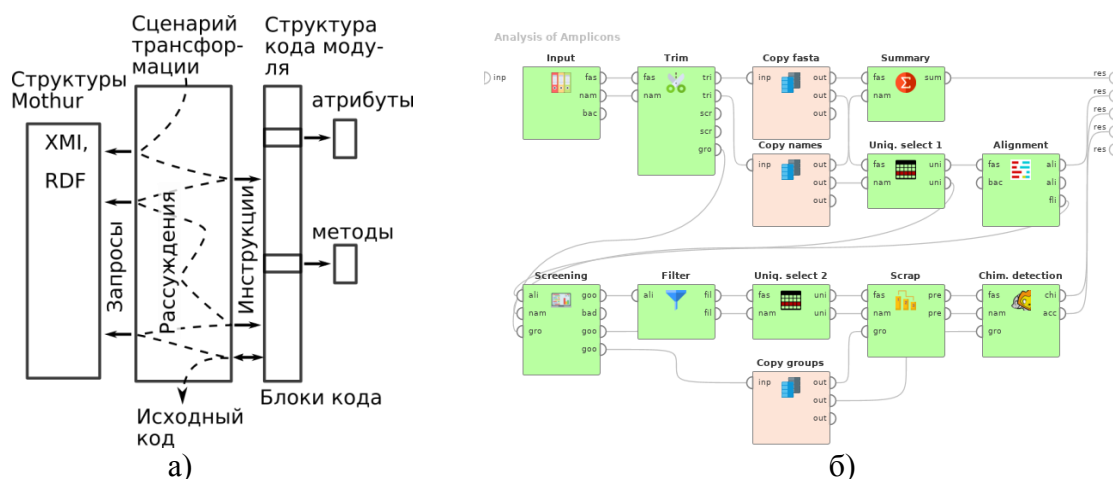


Рисунок 13 – Общая структура процесса порождения исходного кода модуля (а) на основе данных анализа структуры прикладного пакета Mothur; представление части вычислительного процесса анализа ампликонов (б) в виде визуальной диаграммы Rapidminer

Используемая архитектора инфраструктуры трансформации представлена на рисунке 13. Инфраструктура состоит из сервисов (большие блоки). Сервисы «CIM» (Computationally independent model) и «PIM» являются источниками информации, они заполняют базу данных «Сервера модели Mothur» исходными данными для трансформации. Сервер модели и «Сервер онтологий» предоставляют модулю трансформации («Инструмент MDA») исходные данные о структуре модулей Mothur, а также дополнительную информацию, например, из Wikipedia (DBPedia.org), позволяющую дополнить семантическими данными синтезируемую программу.

В рамках проекта используемая архитектура подверглась изменениям в части представления исходной информации CIM в виде результата анализа исходного кода Mothur. Также произведена настройка (в виде классов-адаптеров) блока Сервера моделей на разработанную концептуальную модель «ngs/ngsp» структуры Mothur. Данная модель позволяет задавать различные отношения, описывающий модуль Mothur (ngsp) и термины их предметной области NGS.

Одной из сопутствующих задач являлось исследование новых возможностей LogTalk для представления процедур трансформации. При реализации процедур трансформации использованы большинство предоставляемых LogTalk синтаксических структур и вариантов объектных иерархий. Особенно оказались полезными параметризованные объекты, категории и их иерархии прототипов. Параметризованные объекты позволяют задавать контекст выполнения метода без создания экземпляра класса. Второй необычной но полезной структурой являются категории – инкапсуляция реализаций логически связанных друг с другом методов – и композиционное программирование. Все статические объекты компилятор

LogTalk (например, параметризованные объекты) преобразует непосредственно в Prolog, при этом накладные расходы на производительность кода не больше 1% (рисунок 14).

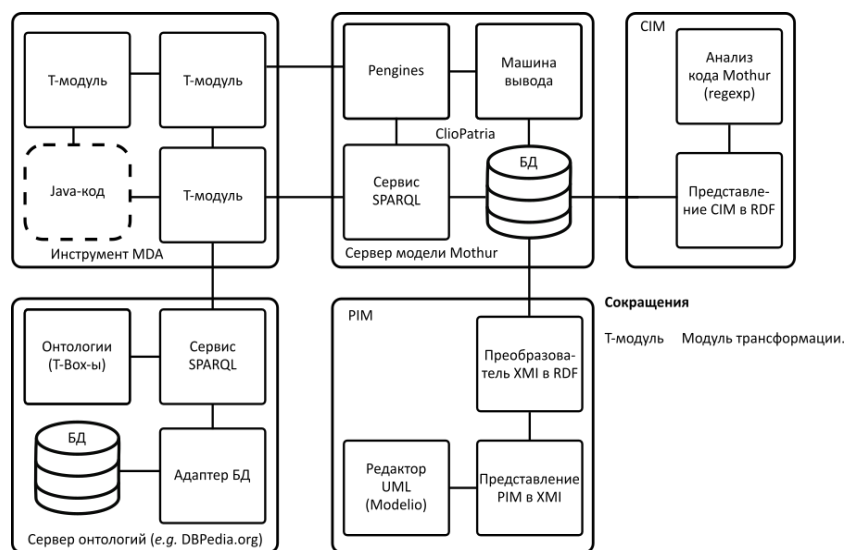


Рисунок 14 – Архитектура инфраструктуры анализа и порождения исходного кода модулей Rapidminer

На рисунке 15 представлен отрывок исходного кода объекта-адаптера запросов сценария синтеза исходного кода к исходным данным RDF-модели. Адаптер содержит один параметр – граф RDF и реализует три метода-запроса «class», «attribute» и «method», предназначенные для распознавания класса, списков его атрибутов и методов, соответственно.

В приведенном отрывке также представлен (в комментарии) пример запроса к данному адаптеру. Результатом запроса, как и в любой реализации Prolog, является множество ответов, представленных в виде наборов значений переменных. В данном примере в качестве ответа выступают наборы имя и идентификатор метода заданного идентификатором «ClassID» класса. Процесс порождения исходного кода состоит из двух этапов. Первый – синтез модели генерируемого объекта, второй – собственно запись исходного кода объекта в определенное место в файле. На рисунке 16 представлен фрагмент генератора модуля Java. Известно, что согласно стандарту Java-1.8 в каждом модуле может находиться только один класс. В соответствии с данной спецификацией генератор модуля состоит из двух методов: генератора преамбулы и генератора класса. Генератор класса реализован в отдельном модуле. Кроме методов генерации модели исходного кода генератор модуля содержит вспомогательные методы, используемые на этапе порождения исходного кода конфигурационных файлов Rapidminer. Например, метод «module_icon_name» синтезирует имя файла, в котором храниться пиктограмма модуля, на основе имени класса.

```

:- object(query( RDF)).
:- protected(xmi/1).
:- public([class/2, attribute/3, method/3]).
xmi(XMI) :- parameter(1, XMI).
class(Name, ID):- % Распознавание
класса в RDF
::xmi(XMI),
XMI::rdf(ID,rdf:type,uml:'Class'),
XMI::rdf(ID,rdfs:label, literal(Name)).
attribute(Name, ClassID, ID):- % ...атрибута...
::xmi(XMI),
XMI::graph(G),
XMI::rdf(ClassID, G:ownedAttribute, ID),
% XMI::rdf(ID, rdf:type, uml:'Property'),
XMI::rdf(ID, rdfs:label, literal(Name)).
method(Name, ClassID, ID):- % ...метода...
::xmi(XMI),
XMI::graph(G),
XMI::rdf(ClassID, G:ownedOperation, ID),
XMI::rdf(ID, rdfs:label, literal(Name)).
:- end_object.

% query(mothur)::method(Name,ClassID,MethodID).

```

Рисунок 15 – Параметризованный объект LogTalk, адаптирующий запросы к структурам исходной RDF-модели

```

:- object(mothur_module,
specializes(java_module)).

:- public(preamble/0). % генерирует начало модуля.
preamble:-
^^preamble,
::set_package('com.rapidminer.ngs.operator'),
::add_skip(1),
create_object(Imports, [instantiates(java_import)],[],[]),
::set_block(imports(Imports)),
::append(Imports),
::add_skip(1),
create_object(ClassDef, [instantiates(mothur_class)],[],[]),
ClassDef::preamble,
::set_block(class(ClassDef)),
::append(ClassDef),
Imports::add('java.util.List'),
Imports::add('com.rapidminer.operator.OperatorDescription'),
Imports::add('com.rapidminer.operator.ports.InputPort'),
% . . . . .
% Указание родительского класса генерируемому классу.
ClassDef::extends('MothurGeneratedOperator').

:- public(module_class/2).
module_class(Class, Name):- % Генератор класса модуля
::current_block(class(Class)),
Class::class_name(Name).

:- public(module_name/1).
module_name(String):-
::module_class(_,Name),
writef::swritef(String,'%w.java',[Name]).
% . . . . .
:- public(module_icon_name/1).
module_icon_name(String):-
::module_class(Class,_),
Class::item(name(Name)),
downcase_atom(Name, DName),
writef::swritef(String,'icon-operator-%w.png',[DName]).

:- end_object.

```

Рисунок 16 – Генератор модуля Rapidminer

Процесс записи синтезируемого кода реализуется предикатами метода «renderitem/2», который дополняется новыми знаниями при наследовании классов-генераторов. На рисунке 17 представлен пример такого дополнения. Метод «renderitem» дополнен правилом синтеза исходного кода элемента «imports». Основная процедура порождения исходного кода, как правило, последовательно обходит в глубину структуру модели кода «code_block» и запускает методы «renderitem» для каждого найденного элемента.

```
:- object(java_module,
          specializes(code_block)).

% . . . . .
renderitem(package(Name), String):-!,
  root::iswritef(String, 'package %w;', [Name]).

renderitem(imports(Object), String):-!,
  Object::render(String).

renderitem(Item, String):-
  ^^renderitem(Item, String). % Вовсе в суперк-
  лассе

% . . . . .
:- public(current_imports/1).
current_imports(Object):-
  ::item(imports(Object)).

:- public(preamble/0).
preamble. % Do nothing

:- end_object.
```

Рисунок 17 – Реализация экспорта исходного кода

Система Rapidmier Studio поддерживает блоки обработки данных в виде расширений системы (plug-ins). Каждый модуль расширения помимо генерируемых классов содержит метаописания, позволяющие классы интегрировать в визуальную среду, а также снабдить все информационные единицы текстами контекстно помощи на разных языках. Метаописания также генерируются автоматически, исходя из структуры класса и исходных RDF-данных. В результате окончательный вариант визуального представления процедур Mothur представляет собой набор блоков из которых строиться модель вычислительного процесса, пример которой представлен на рисунке 13, б.

Таким образом, в результате разработки данного направления создана и формализована система знаний, при помощи которой по результатам анализа исходного кода Mothur осуществляется порождение исходного кода Java-модулей для системы визуального проектирования вычислительных процессов Rapidminer. В виде блоков Rapidminer представлены 143 процедуры обработки данных NGS. На следующем этапе исследований по данному направлению необходимо разработать генераторы визуального представления модулей вычислительных сред NGS, таких как QIIME, QIIME2, Usearch и др., что позволит решить две

задачи. Первая - это расширить методический комплекс алгоритмами других прикладных пакетов, вторая - это актуализировать процесс проектирования вычислений на текущее состояние отрасли NGS.

Таким образом, для поддержки исследований в метагеномном анализе, который позволяет описывать микробные сообщества с ранее недоступной точностью, на данном этапе разработана система формализованных знаний, позволяющих преобразовывать описания структур модулей анализа NGS в визуальные модели. На основе этих моделей на следующих этапах проекта будут реализованы программы визуального программирования процедур анализа ампликонов, модули обеспечения хранения исходных и промежуточных данных в облачном хранилище, интегрировать процедуры и данных, организованные разными исследованиями, публиковать семантически-размеченные данные в Интернете, а также разрабатываться методики автоматизации проектирования распределенных вычислительных процессов на вычислительных кластерах.

3 Алгоритм построения сетей взаимодействия видов в сообществах микроорганизмов на основе результатов мониторинговых экологических исследований с привлечением геномных и метагеномных данных

Краткий результат главы. В рамках работы была реализована задача расчетов корреляционной матрицы на основе таблицы представленности видов, статистической коррекции значений коэффициентов корреляций и графической визуализации сети взаимодействий между организмами сообщества.

3.1 Описание алгоритма

В качестве программного средства для реализации алгоритма построения корреляционной сети была выбрана свободно распространяемая статистическая среда программирования R. Среда R содержит большое количество встроенных функций для статистической обработки данных кроме того для R доступен большой набор пакетов реализующих разные статистические методы. Общая блок схема алгоритма приведена на рисунке 18.

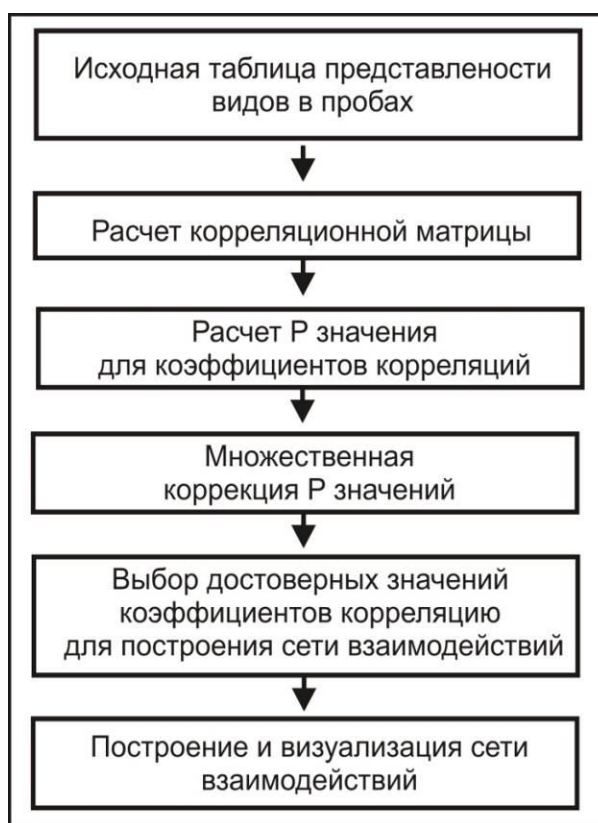


Рисунок 18 – Блок схема алгоритма построения корреляционной сети взаимодействия между организмами в сообществе

Алгоритм включает в себя несколько этапов обработки информации:

- 1) Считывание таблицы, характеризующей представленность таксонов в биологических пробах.
- 2) Тестирование выборок, представленности таксонов в пробах на соответствие закону нормального распределения с помощью теста Шапиро – Уилка.
- 3) Выбор способа расчета коэффициента корреляции. Коэффициент корреляции Пирсона при нормальных законах распределения таксонов в пробах и коэффициент корреляции Спирмена для не нормально законов распределений.
- 4) Расчет матрицы значений коэффициентов корреляции.
- 5) Расчет P значений, для определения достоверности значений коэффициентов корреляций (с помощью распределения Стьюдента для коэффициентов корреляции Пирсона или с помощью W статистики Спирмена).
- 6) Коррекция P значений на множественное тестирование с помощью метода Бенджамини — Хохберга.
- 7) Замена недостоверных значений ($P > 0.05$) на ноль (недостоверные корреляции).
- 8) Использование матрицы коэффициентов корреляции для построения ненаправленного графа.
- 9) Визуализация ненаправленного графа в виде корреляционной сети взаимодействия организмов.

В качестве средств визуализации сети корреляционных взаимодействий использовались пакеты «igraph» [8] и «qgraph» [9] для языка программирования R.

Дополнительно функции пакета «igraph» в алгоритме позволяет рассчитать различные показатели, помощью которых можно определить важность таксонов в сообществах. К этим показателям относятся: центральность таксона - вида; количество связей, формируемых таксоном с другими видами.

3.2 Апробация алгоритма

Алгоритм был апробирован на данных опубликованных в работе [10]. Для анализа была взята таблица, характеризующая представленность различных видов бактерий в 27 образцах воды из фотического слоя пелагиали озера Байкал. Информация о представленности видов в пробах определялась с помощью метабаркодинга на основе региона V3-V4 16S рибосомной РНК. ПЦР продукты, полученные из смеси ДНК микроорганизмов расшифровывались с помощью секвенатора нового поколения GS 454 FLX (Roche, USA) в Лимнологического института СО РАН. Анализ данных метагеномного секвенирования был выполнен с помощью программы Mothur 1.19.0 [11].

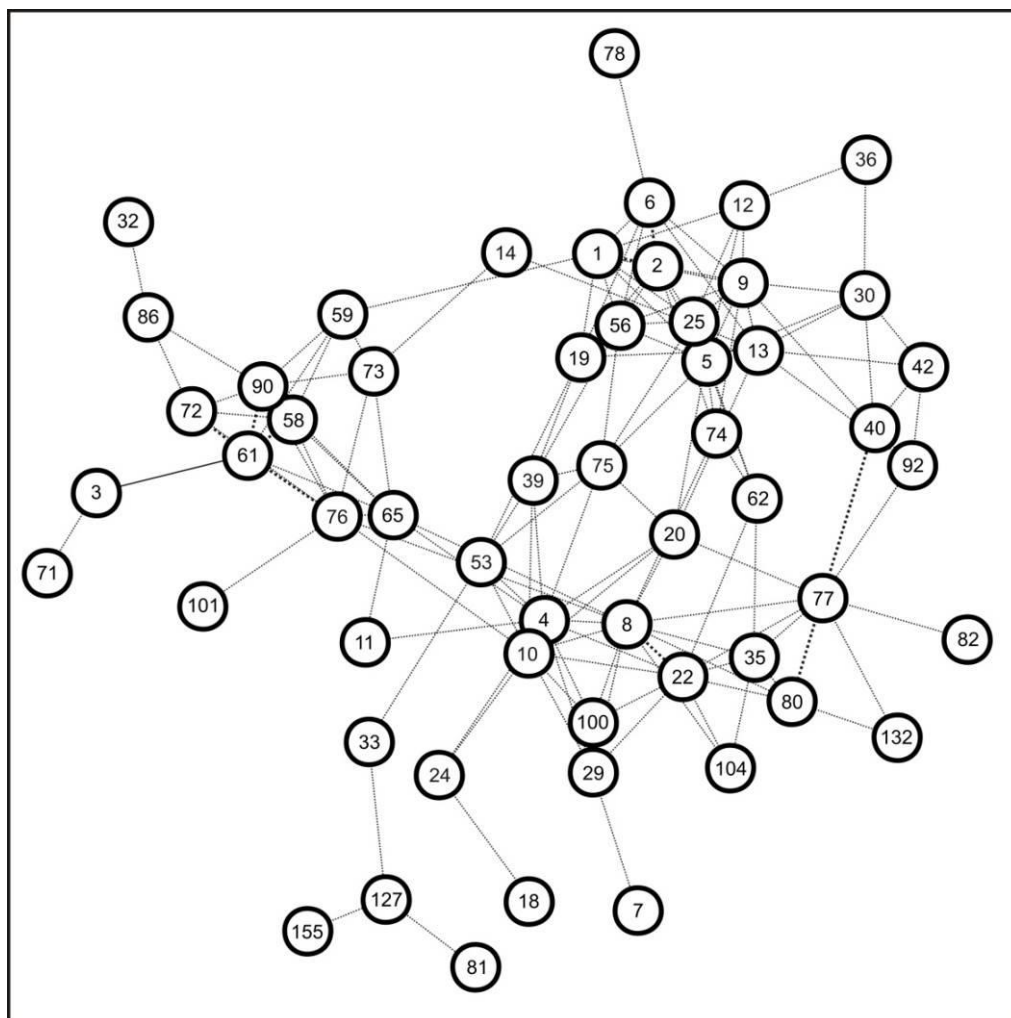


Рисунок 19 – Пример работы алгоритма построения корреляционной сети взаимосвязей между организмами в сообществе микроорганизмов. Рассматривается бактериальное сообщество экосистемы фатического слоя пелагиали озера Байкал. Цифрами обозначены виды бактерий, пунктирные линии отображают положительные корреляционные связи, сплошные линии отрицательные корреляционные связи, толщина линий соответствует силе взаимосвязи (чем толще линия, тем больше абсолютное значение коэффициента корреляции).

После первичного статистического анализ данных по разработанному алгоритму для расчетов коэффициентов корреляции был выбран ранговый критерия Спирмена. Минимально достоверные значения коэффициентов корреляции по абсолютному значению оказались больше либо равными 0.53 ($\alpha = 0.05$). Реконструированная сеть межвидовых взаимодействий внутри сообщества бактерия приведена на рисунке 1.2. Сеть включила в себя 60 узлов соответствующих определенным видам бактерий и 149 связей между этими узлами. Анализ сети показал, что только одна связь из 149 отображает отрицательное значение коэффициента корреляции, все остальные связи были положительными. Это означает, что в исследованном

сообществе озера Бакал большинство видов микроорганизмов находятся в мутуалистических взаимоотношениях. Вероятно, в большинстве случаев продукты жизнедеятельности одного вида микроорганизмов являются субстратом для другого вида микроорганизмов. Конкуренция за общие ресурсы практически отсутствует.

Разработанный алгоритм построения сетей взаимодействия между организмами в сообществах позволяет выделить в исследуемой экосистеме ключевые звенья – виды, образующие каркас видов первичных продуцентов органического вещества и видов потребителей. Сеть взаимодействий позволяет выделить в основном сообществе с помощью кластеризации группы видов с более тесной связью друг с другом и менее связанные с остальными видами сообщества (структурные подгруппы видов). Анализ сети взаимодействий позволяет перейти к следующему этапу – разработки динамической системы для прогнозирования поведения сообщества и экосистемы оз. Бакал при изменении условий среды.

4 Анализ проб фотического слоя озера Байкал 2018 г методами микроскопии и микробиологии и подготовка проб для секвенирования NGS

Краткий результат главы. В ходе экспедиционных работ 2018 г в разные сезоны, начиная с ледового периода, произведен отбор 80 проб воды из разных экотопов оз. Байкал, включая зоны антропогенной нагрузки. В результате исследований определено количество (КОЕ/мл) и пространственное распределение органотрофных бактерий в верхнем слое (0-25 м) воды на 33 станциях в период с мая по сентябрь 2018 г. и общая численность бактерий (ОЧБ) в образцах из разных экотопов Байкала. Определена видовая структура, количественные показатели и пространственное распределение весеннего и летнего фитопланктона пелагической и литоральной зон Байкала в 2018 г. Оптимизирован метод выделения ДНК из природных образцов. Преимуществом метода является включение дополнительного этапа с непосредственной обработкой фильтра из аналитической трековой мембраны для концентрации биомассы из проб объемом 20 л. С использованием данного метода получены препараты ДНК из проб, отобранных из различных экотопов оз. Байкал в период весна-лето 2018 г.

4.1 Отбор проб планктонных сообществ микроэукариот и прокариот из разных экотопов озера Байкал для метагеномного анализа

В 2018 г. в разные сезоны, начиная с ледового периода, произведен отбор проб воды из разных экотопов оз. Байкал, включая районы повышенной антропогенной нагрузки (п. Листвянка, прол. Малое Море) и фоновые районы. Во время ледовых экспедиции в середине марта на центральной станции разреза Листвянка-Танхой (Южный Байкал) и станциях пролива Малое Море пробы отобраны с нижней поверхности льда водолазами с помощью шприцов; интегральные пробы отобраны батометром Нискина (НТФ Вольта, Россия) (V=20 л) (таблица 1); придонный слой воды – при помощи бентосной гравитационной трубки для отбора донных осадков. В период открытой воды пробы отбирали, начиная с конца мая до конца сентября, по всей акватории озера Байкал. Для сравнительного анализа взяты пробы воды из фотического (0–25м) слоя воды на 17 станциях пелагиали оз. Байкал. В ходе экспедиций на НИС «Верещагин» и НИС «Папанин» ЛИН СО РАН пробы воды отобраны с помощью системы батометров карусели SBE-32 (Carousel Water ampler, фирмы Sea-Bird Electronics, Inc. США) и батометром Нискина для химического анализа, подсчета численности и биомассы фитопланктона, общей численности бактерий, численности культивируемых гетеротрофов на среде РПА:10 и определения таксономического состава сообществ бактерий и микроскопических эукариот методом NGS. Всего для метагеномного анализа отобрано 80 проб по 20 л (таблица 1).

Таблица 1 – Календарь отбора проб воды из озера Байкал в течение 2018 г.

№	Станция	Координаты	Глубина, м	март	май	июнь	июль	август	сентябрь
1	Академический хребет	53 55.6927 107.992494	1, 5, 10, 15, 20, 25	15.03		1.06	30.07		24.09
2	п. Листвянка (80 м от берега)	51 51.8247 104 50.6089	0, 2, 3, 5, 7	23.03			11.07		
3	Варначка-Танхой (50 м от берега, р-н п. Б. Коты, глуб. 10 м)	51 54.5' 105 06.21	0, 2, 3, 5, 7				11.07		
4	Бухта Песчаная (глубина 10 м)	52 15.514 105 42.270	0, 2, 3, 5, 7				12.07		
5	Бухта Ая (глубина 10 м)	52 47.332 106 36.445	0, 2, 3, 5, 7				15.07		
6	м. Арал-м. Хобой, глуб. 330 м	53 26.563 107 40.447	1, 5, 10, 15, 20, 25						
7	М. Хобой (Сев. оконечность о. Ольхон напротив м. Хобой, 60 м от берега, глубина 10 м)	53 24.466 107 47.289	0, 2, 3, 5, 7	12.03- 13.03			15.07		
8	Мыс Зундук (м. Зундук – м. Будун, глубина 200 м)	53 21.456 107 24.580	1, 5, 10, 15, 20, 25	12.03			14.07		
9	Прол. Ольхонские ворота, 100 м от берега, глуб. 10 м	53 01.034 106 55.470	0, 2, 3, 5, 7	12.03			13.07		
10	Бухта Базарная (напротив п. Сахюрта, глубина 10 м)	53 01.245 106 53.410	0, 2, 3, 5, 7				13.07		
11	Зал. Куркутский (300 м от берега, глубина 5 м)	53 02.082 106 51.008	0, 2, 3				13.07		
12	Зал. Мухур (м. Шидя, глуб. 6 м)	53 03.274 106 48.160	0, 2, 3				13.07		
13	Зал. Хужирский (п. Хужир, глуб. 10-12 м)	53 11.758 107 19.075	0, 2, 3, 5, 7				15.07		
14	Зал. Нюрганская губа (п. Песчанка, глуб. 10-12 м)		0, 2, 3, 5, 7				14.07		
15	Мыс Уюга – мыс Цаган-Хушун (Курма напротив о. Олырек, глуб. 10 м)	53 09.680 106 58.529	0, 2, 3, 5, 7				14.07		
16	Листвянка-Танхой	51 48.021 104 59.066	1, 5, 10, 15, 20, 25	23.03	27.05			1.08	27.09
17	12 км от п. Кулпука	51 40.578 103 52.309	1, 5, 10, 15, 20, 25		26.05			3.08	17.09
18	Маригуй-Сотзан	51 38.710 104 13.715	1, 5, 10, 15, 20, 25		26.05			2.08	18.09
19	Толстый-Снежная	51 36.402 104 44.147	1, 5, 10, 15, 20, 25		27.05			3.08	18.09
20	Кадильный-Мишиха	51 46.731 105 22.528	1, 5, 10, 15, 20, 25		28.05			1.08	27.09
21	Красный Яр-Харауз	52 20.722 106 03.870	1, 5, 10, 15, 20, 25		29.05		31.07		26.09
22	Анга-Сухая	52 39.590 106 50.978	1, 5, 10, 15, 20, 25		29.05		25.07		26.09
23	Ухан-Тонкий	52 53.630 107 31.001	1, 5, 10, 15, 20, 25		30.05		26.07		25.09
24	Хобой-Крестовый	53 21.278 108 13.078	1, 5, 10, 15, 20, 25		31.05		26.07		24.09
25	Заворотный-Сосновка	54 16.860 108 44.473	1, 5, 10, 15, 20, 25			1.06	27.07		23.09
26	Елохин-Давша	54 27.052 109 04.164	1, 5, 10, 15, 20, 25			1.06	27.07		23.09
27	Котельниковский-Амундакан	55 02.388 109 25.939	1, 5, 10, 15, 20, 25			3.06	28.07		22.09
28	Байкальское-Туралы	55 19.487 109 28.707	1, 5, 10, 15, 20, 25			3.06	29.07		22.09
29	Тья-Немнянка	55 33.968 109 35.597	1, 5, 10, 15, 20, 25			3.06	28.07		21.09
30	7 км от Нижнеангарска	55 42.876 109 36.573	1, 5, 10, 15, 20, 25			2.06	28.07		21.09
31	Малое Море центр	53 14.500 107 15.416	1, 5, 10, 15, 20, 25			5.06	30.07		
32	Малое Море выход (Хобой-Арал)	53 26.563 107 40.447	1, 5, 10, 15, 20, 25			4.06	30.07		24.09
33	Баргузинский залив	53 27.245 108 44.387	1, 5, 10, 15, 20, 25		31.05				24.09
34	Чивыркуйский залив	53 42.564 109 06.384	1, 5, 10, 15, 20, 25			4.06			23.09

4.2 Микробиологический анализ

Одноклеточные водоросли и бактерии важнейшие участники биогеохимических циклов в большинстве водных экосистем. Взаимодействия между первичными продуцентами и бактериями влияют на физиологию этих организмов, приводят к изменению условий окружающей их среды и участвуют в формировании разнообразия экосистемы [12]. Растворенные органические вещества, продуцируемые микроводорослями, усваиваются в основном гетеротрофными бактериями, поэтому изменение количественных и качественных характеристик фитопланктона влияет на численность и видовой состав бактерий [13].

Для определения общей численности бактерий (ОЧБ) использовали световую эпифлуоресцентную микроскопию. Для этого 5 мл интегральной пробы воды (с глубин 0 м, 5 м, 10 м, 15 м, 20 м, 25 м) фиксировали 1 % р-ром глутарового альдегида и окрашивали флуорохромным красителем ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндол) (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 2-3 мин (Porter and Feig, 1980). Затем окрашенную пробу осаждали на поликарбонатный фильтр (Millipore, Ирландия) с диаметром пор 0,2 мкм с помощью фильтровальной установки (Sartorius, Германия). Фильтры промывали стерильной водой, помещали на предметное стекло в каплю иммерсионного нефлуоресцирующего масла (МиниМед, Россия), выдерживали в темноте 20 мин. Полученные препараты анализировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия) с ультрафиолетовой лампой HBO 50W/AC ASRAM при спектре возбуждения 365 нм. Для подсчета бактериальных клеток просматривали не менее 20 полей зрения на образец, вычисление ОЧБ проводили, как описано ранее [14]. Микрофотографии получали камерой PIXERA Penguin 600CL с программным обеспечением AXIOSET.

В результате исследований показано, что максимальная численность бактерий в период подледного цветения фитопланктона составляет 1.0×10^7 кл./мл в подледных обрастаниях на станции мыс Хобой (район Малое Море) (таблица 2). В подледном слое воды ОЧБ варьирует от 0.5×10^6 кл./мл до 1.6×10^6 кл./мл. В период май-июнь максимальная численность 3.5×10^6 кл./мл зафиксирована в Чивыркуйском заливе, ОЧБ на разных станциях в фотическом слое воды варьировала от 0.5×10^6 кл./мл до 2.2×10^6 кл./мл (таблица 2).

Для культивирования органотрофных бактерий из природных образцов использовали рыбо-пептонный агар, разбавленный в 10 раз (РПА/10). При подборе среды учитывали, что микроорганизмы, развивающиеся в течение цветения фитопланктона, имеют гетеротрофный тип обмена веществ и являются типичными обитателями пресных водоемов с нейтральным рН. Посевы выполняли глубинным способом в 2-х повторностях и культивировали при температуре 25 °С.

Таблица 2 – Общая численность бактерий в подледных обрастаниях и фотическом слое воды из оз. Байкал.

№	Станция	ОЧБ, кл/мл		
		март	май	июнь
1	Академический хребет, подледные обрастания	0.7×10^6		
2	Академический хребет, фотический слой воды	1.6×10^6		3.0×10^6
3	Академический хребет, придонная вода	2.2×10^6		
4	Пролив Малое море Ольхонские ворота (100 м от уреза), подледные обрастания	1.2×10^6		
5	Пролив Малое море Ольхонские ворота (100 м от уреза), фотический слой воды	1.3×10^6		
6	п. Листвянка (80 м от берега напротив кафе Алания), фотический слой воды	1.1×10^6		
7	Мыс Хобой (Северная оконечность о. Ольхон напротив м. Хобой, 60 м от берега, глубина 10 м), подледные обрастания	1.0×10^7		
8	Мыс Хобой (Северная оконечность о. Ольхон напротив м. Хобой, 60 м от берега, глубина 10 м), фотический слой воды	0.5×10^6		
9	Мыс Зундук (м. Зундук – м. Будун, глубина 200 м), фотический слой воды	1.6×10^6		
10	Листвянка-Танхой, фотический слой воды	1.2×10^6	0.9×10^6	
11	12 км от Кулпука, фотический слой воды		2.2×10^6	
12	Маритуй-Солзан, фотический слой воды		1.7×10^6	
13	Толстый-Снежная, фотический слой воды		0.5×10^6	
14	Кадильный-Мишиха, фотический слой воды		1.4×10^6	
15	Красный Яр-Харауз, фотический слой воды		0.9×10^6	
16	Анга-Сухая, фотический слой воды		1.4×10^6	
17	Ухан-Тонкий, фотический слой воды		1.0×10^6	
18	Хобой-Крестовый, фотический слой воды		1.0×10^6	
19	Заворотный-Сосновка, фотический слой воды			1.2×10^6
20	Елохин-Давша, фотический слой воды			1.4×10^6
21	Тья-Немнянка, фотический слой воды			0.7×10^6
22	Малое Море центр, фотический слой воды			1.6×10^6
23	Малое Море выход (Хобой-Арал), фотический слой воды			1.4×10^6
24	Баргузинский залив, фотический слой воды		1.2×10^6	
25	Чивыркуйский залив, фотический слой воды			3.5×10^6

В результате работы было определено количество органотрофных бактерий (КОЕ/мл), культивируемых на среде РПА/10 в верхнем слое 0-25 м воды на 33 станциях в период с мая по сентябрь (рисунок 20). В целом, выявлено, что численность органотрофных бактерий в период цветения весеннего фитопланктона в пелагической зоне озера выше чем в летний и осенний сезоны. Наименьшее количество органотрофов выявлено в литоральной зоне Южного и Среднего Байкала в июле (0-27 КОЕ/мл).

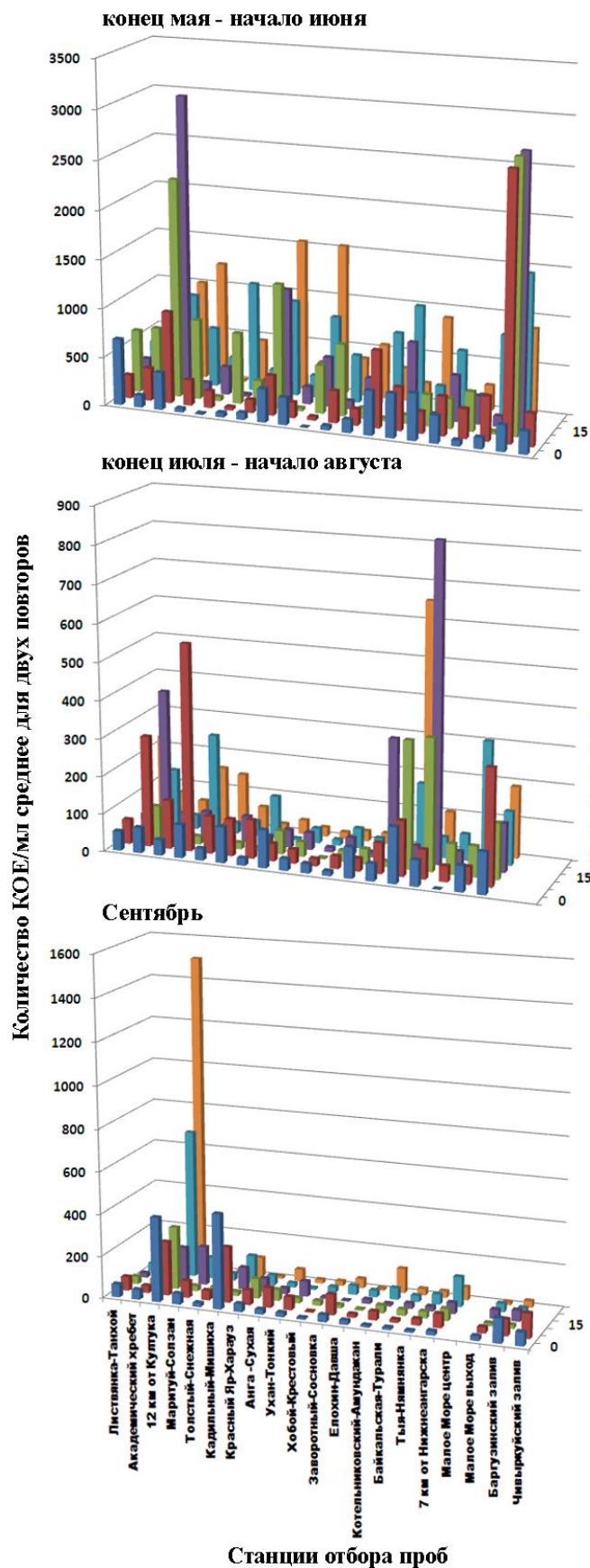


Рисунок 20 – Количество гетеротрофных бактерий (КОЕ/мл), культивируемых на среде РПА/10, 17 станций оз. Байкал в мае-сентябре 2018 г.

4.3 Микроскопический анализ состава фитопланктона

Для последующего сравнительного анализа таксономического разнообразия микроэукариот, полученных данными NGS, была проведена оценка численности и биомассы фитопланктона в отобранных в 2018 г. пробах (таблица 1). Качественные пробы, отбиравные большой сетью Джеди, фиксировали раствором Люголя с ацетатом натрия по общепринятой методике [15]. Для анализа видовой принадлежности микроводорослей собранный батометром материал сразу осаждали на фильтры (“Whatman”, США) с диаметром пор 1 мкм. После высушивания на воздухе фильтры приклеивали на столики для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), затем в лабораторных условиях напыляли золотом и анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Philips SEM 525M (Голландия). Для количественного учета фитопланктона пробы концентрировали с помощью осадочного метода [16, 17], подсчет клеток микроводорослей проводили по методу Гензена [16] на разграфленном тонком предметном стекле в капле, взятой штемпель-пипеткой объемом 0,1 мл в двух повторностях с помощью светового микроскопа «Axiovert 200» ZEISS (Германия) с фотокамерой Pixera Penguin 600CL. Биомассу клеток определяли расчетным способом [18, 19].

Проведен микроскопический анализ пролива Малое Море и нескольких станций литоральной зоны. В весенний подледный период общая численность микроводорослей были ниже, чем в летний период (рис. 21), были обнаружены диатомовые, хризифитовые водоросли и их стоматоцисты (рис. 22). Максимальные значения общей численности и биомассы были отмечены на станции пролив Ольхонские Ворота, где доминирующим по численности видом была диатомовая водоросль *Fragilaria radians* (Kützinger) D.M.Williams & Round, по биомассе доминировал более крупноклеточный вид динофлагеллят *Gymnodinium baicalense* N.L.Antipova. На станциях мыс Зундук, мыс Хобой и Академический хребет наибольшей численности достигала зеленая водоросль *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová. По биомассе на станциях мыс Зундук и Академический хребет доминировали диатомеи *Aulacoseira baicalensis* (Wislouch) Simonsen; на станции мыс Хобой – динофлагелляты *G. baicalense*. На пелагической станции Листвянка-Танхой (центр) по численности доминировали гаптофитовые *Chrysochromulina parva* Lackey, содоминирующими были зеленые водоросли *M. griffithii*, *Koliella longiseta* (Vischer) Hindak и диатомеи *Nitzschia graciliformis*. По биомассе доминировали динофлагелляты *Gymnodinium baicalense* и диатомеи *F. radians*. В литоральной зоне на станции п. Листвянка по численности доминировали диатомеи *Nitzschia graciliformis* Lange-Bertalot et Simonsen emend. Genkal et Popovskaya., по биомассе – динофлагелляты *Peridinium baicalense* Kiselev & V. Zvetkov (рисунок 23).

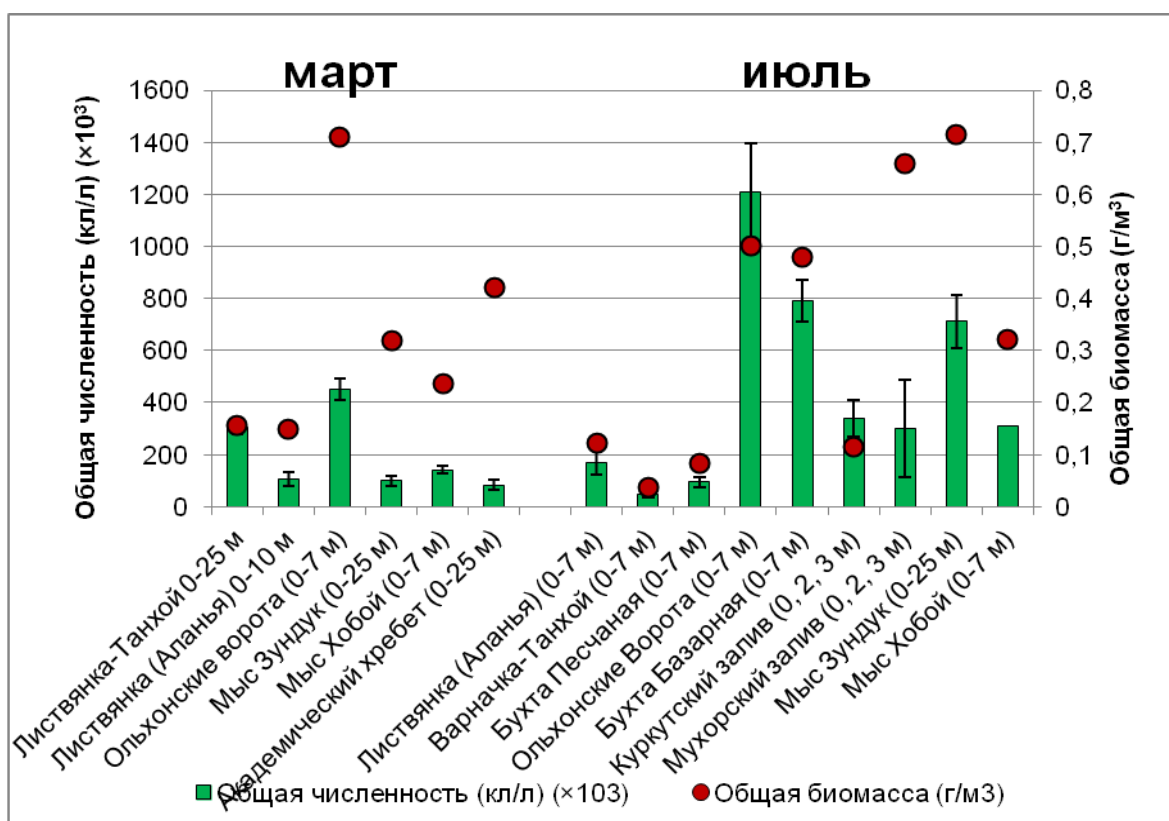


Рисунок 21 – Общая численность и биомасса микроводорослей пролива Малое Море, а также нескольких станций литоральной зоны южной и средней котловин озера Байкал в марте и июле 2018 г.

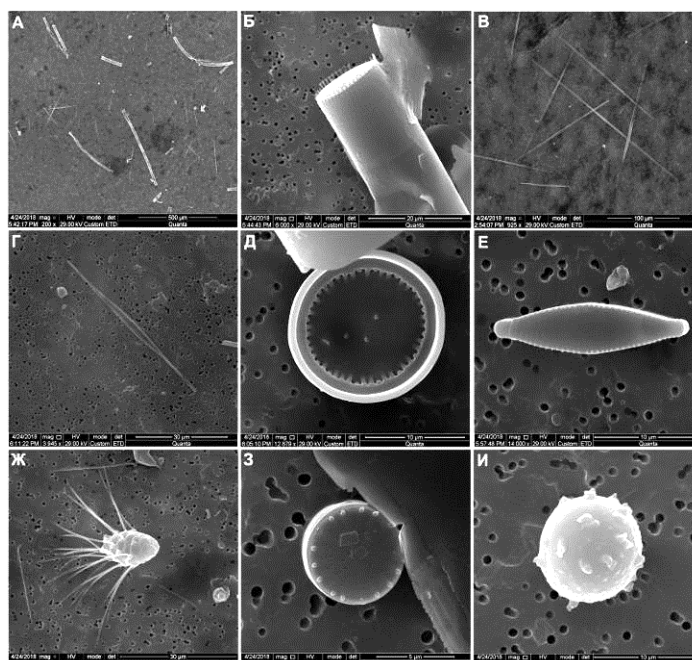


Рисунок 22 – Микроводоросли (СЭМ). Общий вид (А), диатомея *Aulacoseira islandica* (Б); *Fragilaria radians* (В); *Nitzschia graciliformis* (Г); *Cyclotella minuta* (Д); *Fragilaria* sp. (Е); хризофитовая *Mallomonas* sp. (Ж); центрическая диатомея (З); стоматоциста (И)

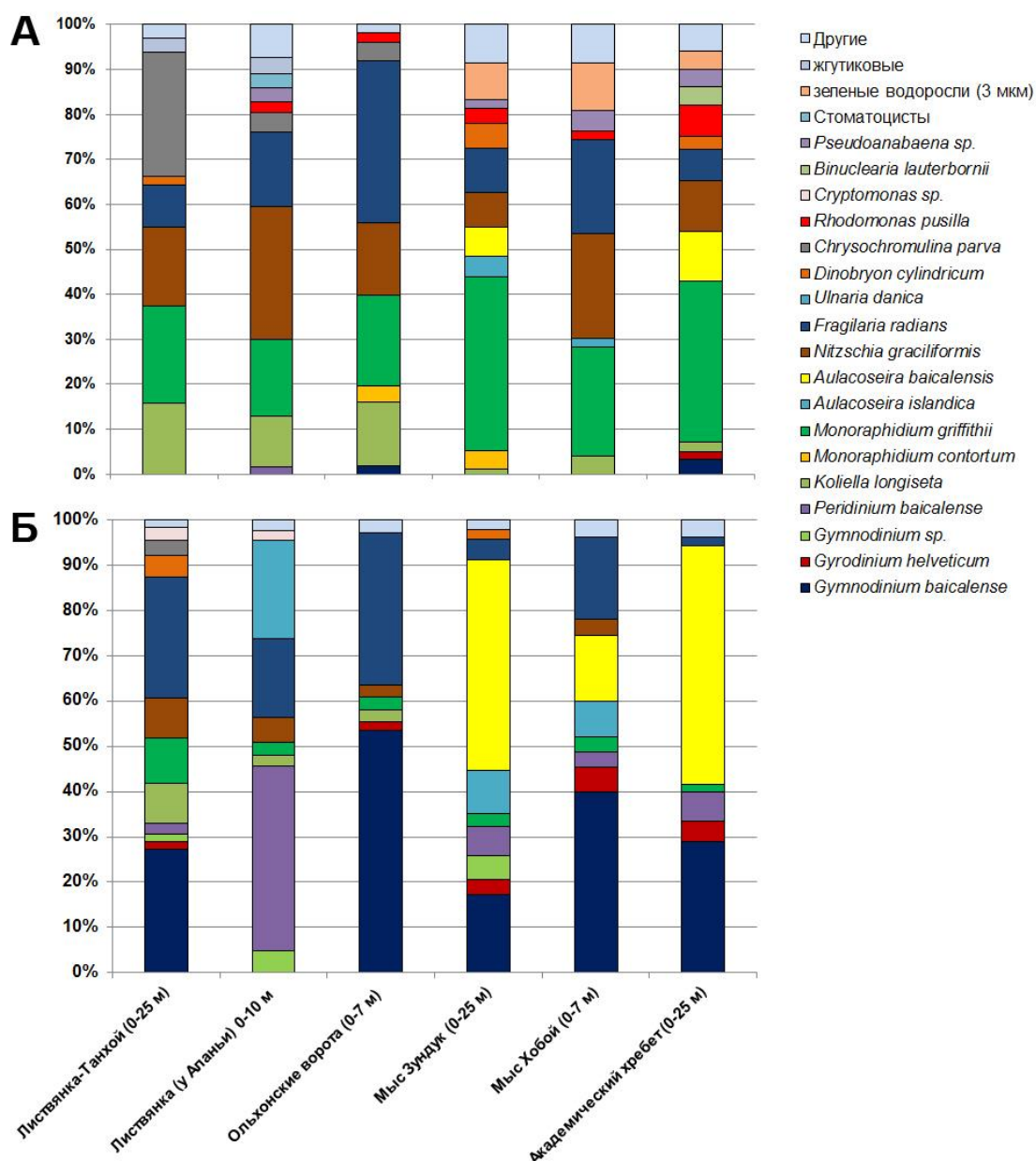


Рисунок 23 – Процентное соотношение видов микроводорослей пролива Малое море и нескольких станций литоральной зоны южной и средней котловин озера Байкал в марте. По численности (А) и по биомассе (Б)

По данным микроскопического анализа выявлено, что весенний фитопланктон 2018 г., в основном, был представлен диатомовыми, хризофитовыми и зелеными водорослями (рисунок 24, 25). Основу биомассы и численности в Южном и Среднем Байкале стабильно составляла диатомовая водоросль *F. radians* (= *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabitchevsky), на долю которой приходилось 25-87% от общего количества фитопланктона.

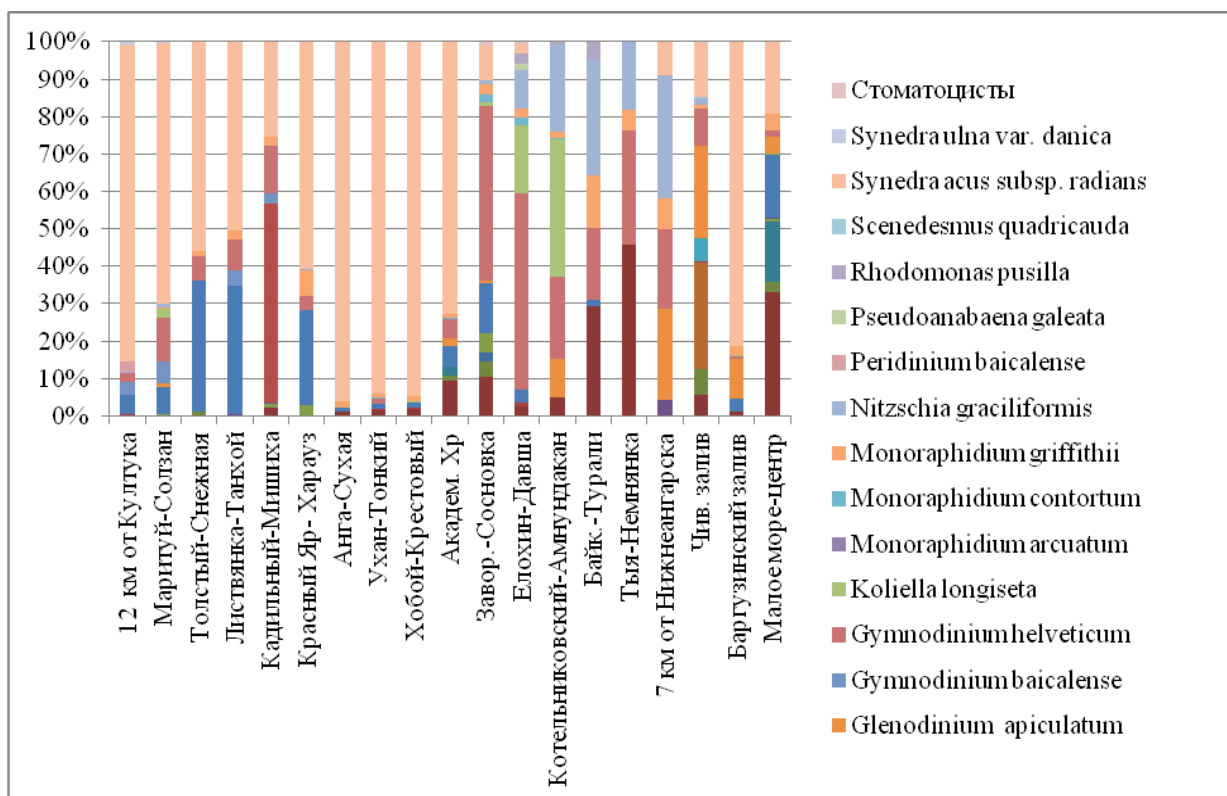


Рисунок 24 – Относительное содержание видов весеннего фитопланктона пелагиали Байкала по биомассе в 2018 г.

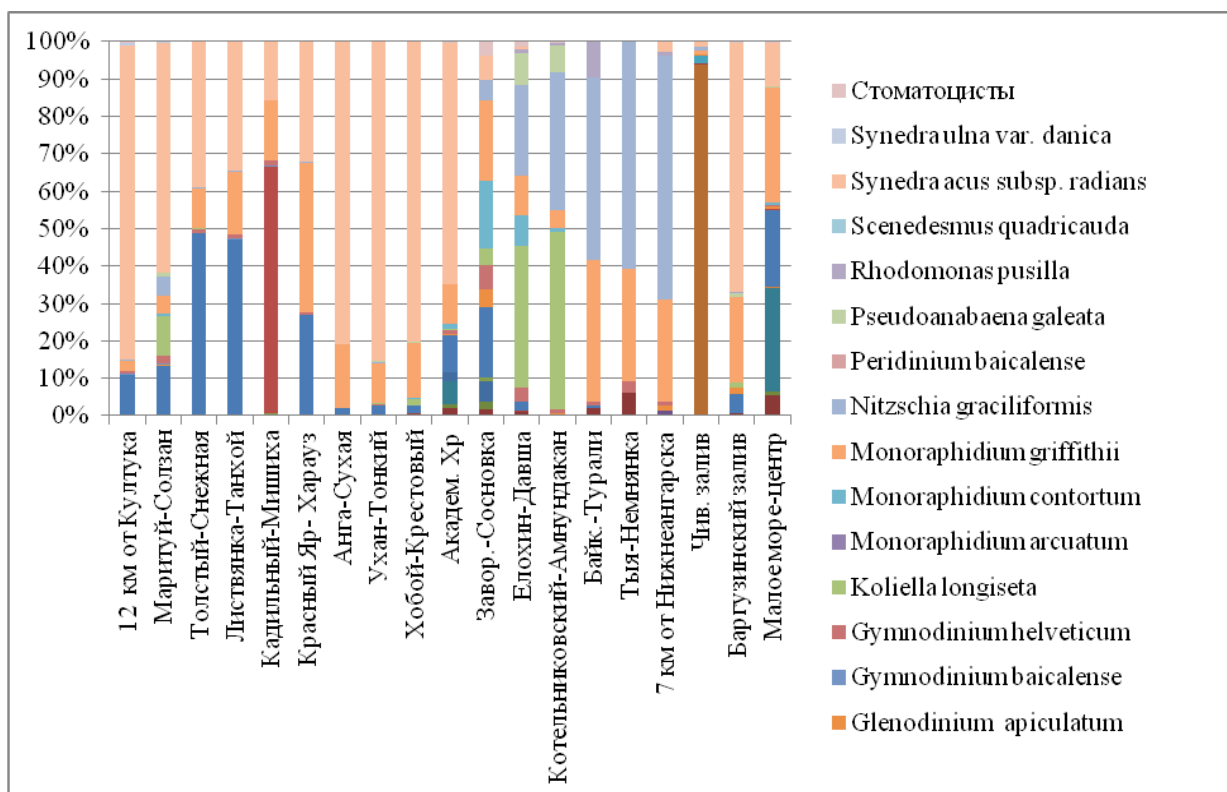


Рисунок 25 – Относительное содержание численности видов весеннего фитопланктона пелагиали Байкала в 2018 г.

В Северной части озера преобладающими, как по численности, так и по биомассе, были зеленые водоросли *K. longiseta* и представители рода *Monoraphidium*, на долю, которой приходилось до 50% от общего количества фитопланктона. На некоторых станциях были зафиксированы максимальные показатели диатомовой *N. graciliformis*, которая составляла от 50% до 65% от общего количества фитопланктона.

В июле количественные показатели микроводорослей варьировали в широком диапазоне. Общая численность микроводорослей изменялась в пределах от 45,21 до 1211,15 тыс. кл./л., а биомасса – от 0,038 до 0,72 г/м³ (рисунок 21). По данным СЭМ показано, что в пробах, отобранных в июле, были обнаружены диатомовые, динофитовые, сине-зеленые, хризофитовые водоросли и их стоматоцисты (рисунок 26). В пробах отмечено большое количество бентосных видов диатомовых водорослей, которые не составляли высокую численность, но вносили разнообразие в сообщества. Максимальное значение общей численности было отмечено, также как и в марте, на станции Ольхонские Ворота, где доминировал вид *M. Griffithii* (рисунок 27). Наибольшая биомасса была на станции мыс Зундук, где доминировали диатомеи *F. radians*. На станциях п. Листвянка и Варначка-Танхой по численности доминировал вид *M. griffithii*, по биомассе хризофитовые *Dinobryon cylindricum* O.E. Imhof. Наименее продуктивной была станция Варначка-Танхой (45,21 тыс. кл./л., 0,038 г/м³). Кроме того, зеленая водоросль *M. griffithii* по численности преобладала на станциях бухта Базарная, Куркутский залив и бухта Песчаная. В Мухорском заливе по численности доминировала сине-зеленая водоросль *Anabaena lemmermannii* P.G. Richter, по биомассе динофлагелляты *Cerathium hirundiella* (O.F. Müller) Dujardin. На станции мыс Зундук по численности – зеленая водоросль *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová, а по биомассе – *F. radians*. На станции мыс Хобой по численности преобладали *Chrysochromulina parva* Lackey, по биомассе – *Gymnodinium* sp (рисунок 27).

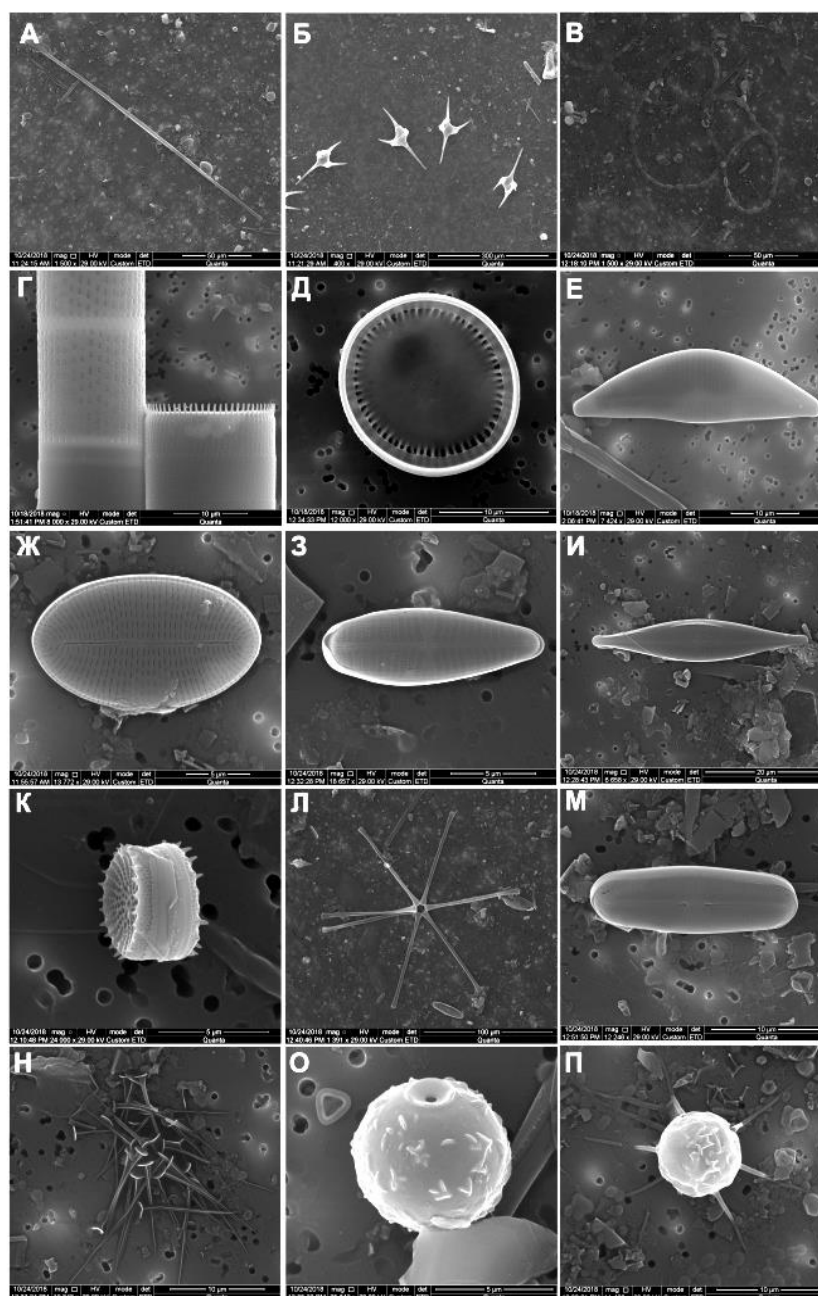


Рисунок 26 – Микроводоросли пролива Малое море и нескольких станций литоральной зоны южной и средней котловин озера Байкал в июле 2018 года (СЭМ). *Fragilaria radians* (А); *Cerathium hirundiella* (Б); *Anabaena* sp. (В); диатомеи *Aulacoseira baicalensis* и *A. islandica* (Г); *Cyclotella minuta* (Д); *Encyonema* sp. (Е); *Cocconeise* sp. (Ж); *Gomphonema* sp. (З); *Navicula* sp. (И); *Stephanodiscus* sp. (К); *Asterionella formosa* (Л); *Achnantheidium* sp. (М); хризифитовые (Н, П); стоматоциста (О)

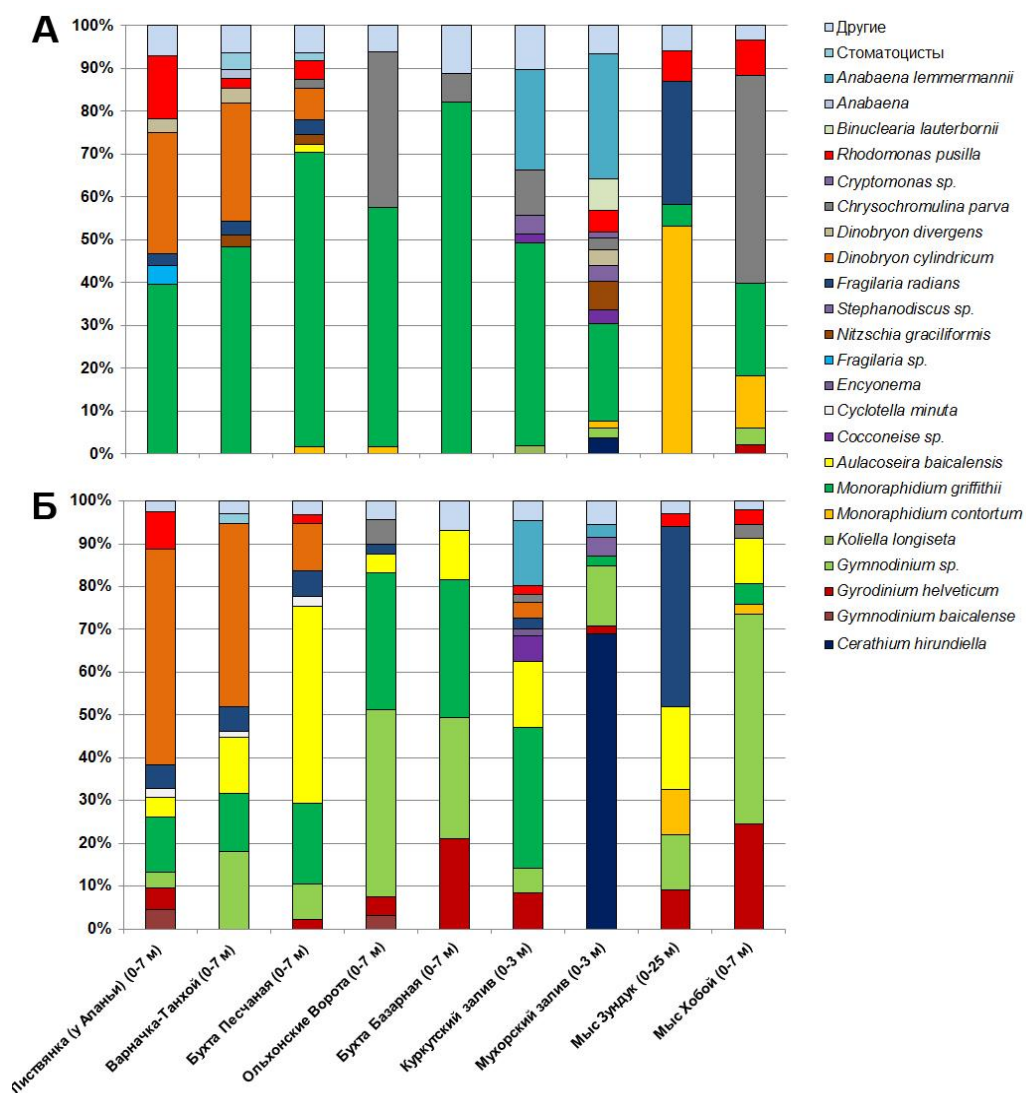


Рисунок 27 – Процентное соотношение видов микроводорослей пролива Малое море и нескольких станций литоральной зоны южной и средней котловин озера Байкал в июле. По численности (А) и по биомассе (Б)

4.4 Оптимизация метода выделения суммарной ДНК из проб водной толщи для секвенирования библиотек ампликонов фрагментов маркерных генов 16S (прокариоты) и 18S (эукариоты) рРНК

Оптимизирован метод выделения ДНК из природных образцов. Преимуществом метода является включение дополнительного этапа с непосредственной обработкой фильтра из аналитической трековой мембраны, который использовался для концентрации биомассы из проб объемом 20 л. При использовании данного метода получены препараты ДНК из проб, отобранных из различных экотопов оз. Байкал в период весна-лето 2018 г.

При анализе данных, полученных по результатам секвенирования библиотек ампликонов фрагментов генов 16S и 18S рРНК из различных образцов воды из озера Байкал 2017 г.

с использованием высокопроизводительной платформы Illumina MiSeq было показано, что имеются различия в уровне вариабельности результатов при использовании различных фильтров при фильтрации проб воды. При получении ДНК из водных образцов фильтрование бактерий осуществляли с помощью поликарбонатного и нитроцеллюлозного фильтров с диаметром пор 0,22 мкм. Показано, что при использовании поликарбонатных фильтров для фильтрации бактерий из водных природных проб результаты имеют более высокую воспроизводимость. Нами выдвинуто предположение, что причиной расхождения результатов может быть плотное связывание биомассы с фильтрами и, как следствие, исключение ее из дальнейшей процедуры выделения ДНК. Поэтому в рамках выполнения работ по проекту в этом году была поставлена задача доработать метод выделения ДНК с тем, чтобы максимально избежать предполагаемых потерь.

В ходе выполнения работ был оптимизирован метод экстракции ДНК, разработанный нами ранее и основанный на ферментативной обработке клеток (отчет по проекту «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона», направление 4, часть 4.1). Преимуществом предложенного метода является включение дополнительного этапа с непосредственной обработкой фильтра из аналитической трековой мембраны (аналог поликарбонатных фильтров), который использовался для концентрации биомассы из проб объемом 20 л. Применение такого подхода значительно увеличивает количество выделяемой ДНК и позволяет избежать потери биомассы, которая остается необратимо связана с фильтром. С использованием данного метода получены 37 препаратов ДНК из проб, отобранных из различных экотопов Байкала в период весна-осень 2018 г.

Биомассу из проб ($V=20$ л) осаждали на фильтры из аналитической трековой мембраны (Реатрек, Россия) с диаметром пор 0,2 мкм с помощью аппарата фильтрационного АФ-142 с компрессором и напорной емкостью из нержавеющей стали (Владисарт, Россия), затем фильтры погружали в контейнер со стерильным ТЕ-буфер (30 мл) и замораживали. Образцы хранили при -80°C до дальнейшего использования. Перед выделением ДНК образцы плавно размораживали при 4°C . Фильтры измельчали в стерильных условиях, добавляли к ним биомассу, осажденную из ТЕ-буфера центрифугированием в течение 30 мин при 16100 об./мин, 4°C . К измельченному фильтру доливали стерильного ТЕ-буфер, добавляли лизоцим до концентрации 2,5 мг/мл и инкубировали при 37°C , 60 мин. Затем к образцам добавляли раствор SDS до конечной концентрации 1 %, дважды замораживали при 20°C и оттаивали при 55°C . После добавления раствора протиназы К до конечной концентрации 182 мкг/мл инкубировали образцы с периодическим перемешиванием в течение 60 мин при 55°C . Про-

цедуру инкубации и добавление протеиназы К повторяли дважды. Лизат отбирали и последовательно экстрагировали фенолом, насыщенным ТЕ-буфером pH 8.0, смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1 и смесью хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 24:1. ДНК из раствора осаждали добавлением 1/10 от объема раствора 3 М ацетата натрия pH 5.2 и двух объемов этилового спирта, выдерживали ночь при -20 °С и центрифугировали 30 мин при 16100 об./мин, 10 °С. Осадок ДНК дважды промывали 70 % этанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в 200 мкл стерильного ТЕ-буфера (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика препаратов ДНК.

№	Шифр	Описание образца	Тип образца	Объем пробы	Концентрация ДНК (нг/мкл)	Растворитель
1	2	3	4	5	6	7
1	BD25	Пр. Ольхонские Ворота п/лед 12.03.18	Геномная ДНК	200	76,5	ТЕ
2	BD26	Пр. Ольхонские Ворота инт. 0-7 м 12.03.18	Геномная ДНК	200	190,0	ТЕ
3	BD27	О. Ольхон м. Хобой п/лед 2 л 13.03.18	Геномная ДНК	200	640,0	ТЕ
4	BD28	Малое Море мыс Хобой инт. 0-7 м, 20 л, 13.03.18	Геномная ДНК	200	141,5	ТЕ
5	BD29	Малое Море мыс Зундук инт. 0-25 м	Геномная ДНК	200	181,5	ТЕ
6	BD30	Академический хребет п/лед, 3 л, 15.03.18	Геномная ДНК	200	77,0	ТЕ
7	BD31	Академический хребет инт. 0-256 20 л, 15.03.18	Геномная ДНК	200	178,5	ТЕ
8	BD32	Академический хребет придон 1л 15.03.18	Геномная ДНК	200	665,0	ТЕ
9	BD33	Листвянка-Танхой инт. 0-25, 20 л, 23.03.18	Геномная ДНК	200	290,0	ТЕ
10	BD34	п. Листвянка, станция Ала-ния инт. 0-5 м, 23.03.18	Геномная ДНК	200	82,5	ТЕ
11	BD35	Кругобайкальская эксп. май-июнь 2018 Листвянка-Танхой, 20 л инт. 0-25 м	Геномная ДНК	200	25,5	ТЕ
12	BD36	Кругобайкальская эксп. май-июнь 2018 пр Малое Море центр, 20 л инт. 0-25 м.	Геномная ДНК	100	515,0	ТЕ
13	BD37	Кругобайкальская эксп. май-июнь 2018 пролив Малое Море вход, 20 л. инт. 0-25 м.	Геномная ДНК	200	475,0	ТЕ

1	2	3	4	5	6	7
14	BD38	Пос. Листвянка ст. Алалия 0-7 м, 20 л 11.07.18	Геномная ДНК	200	71,5	ТЕ
15	BD39	Варначка-Танхой инт. 0-7 м, 20 л, 11.07.18	Геномная ДНК	200	45,0	ТЕ
16	BD40	Бух. Песчанная инт. 0-7м, 20 л, 12.07.17	Геномная ДНК	200	40,5	ТЕ
17	BD41	бухта Ая, инт 0-7, 20 л, 15.07.18	Геномная ДНК	200	480,0	ТЕ
18	BD42	Малое Море мыс Хобой инт. 0-7, 20 л, 15.07.18	Геномная ДНК	200	570,0	ТЕ
19	BD43	Пр. Ольхонские Ворота инт. 0-7м, 20 л., 13.07.18	Геномная ДНК	200	490,0	ТЕ
20	BD44	Бухта Базарная (прол. Сахюрта, глуб. 10 м) 13.07.18	Геномная ДНК	200	400,0	ТЕ
21	BD45	Зал. Мухор (м. Шида, глуби- на 6 м), инт. 0-2 м, 20 л, 13.07.18	Геномная ДНК	200	285,0	ТЕ
22	BD46	Зал. Куркутский (напротив п. Куркут, г. 5 м) инт 0-2м, 20л., 13.07.18	Геномная ДНК	200	350,0	ТЕ
23	BD47	Зал. Хужирский (п. Хужир, глубина 10-12м), инт 0-7 м, 20 л, 14.07.18	Геномная ДНК	200	485,0	ТЕ
24	BD48	Мыс Уюга - мыс Цаган- Хужун (Курма, пролив о. Ольтрек, глуб. 10 м) инт. 0-7 м, 20 л, 14.07.18	Геномная ДНК	200	470,0	ТЕ
25	BD49	Зал. Нюрганская Губа (п. Песчанка, глуб. 10-12 м) 14.07.18	Геномная ДНК	200	385,0	ТЕ
26	BD50	Листвянка-Танхой инт. 0-25 м, 20 л, летняя КБ 2018	Геномная ДНК	200	725,0	ТЕ
27	BD51	Прол. Малое Море центр инт. 0-25 м, 20 л, летняя КБ 2018	Геномная ДНК	200	366,0	ТЕ
28	BD52	Прол. Малое Море вход инт. 0-25 м, 20 л, летняя КБ 2018	Геномная ДНК	200	430,0	ТЕ
29	BD53	Прол. Малое Море вход инт. 0-25 м, 20 л, осень КБ 2018	Геномная ДНК	200	403,0	ТЕ
30	BD54	Листвянка-Танхой инт. 0-25 м, 20 л, осенняя КБ 2018	Геномная ДНК	200	390,0	ТЕ

4.5 Секвенирование

Для секвенирования библиотек ампликонов фрагментов генов 16S и 18S рРНК на платформе Illumina MiSeq с целью анализа состава микробного сообщества оз. Байкал 28.11.2018 г. в ООО “Генотек” (Москва) в рамках исполнения Контракта № 0334100021718000037-0009343-01 от 26.10.2018 г. было направлено 76 образцов геномной ДНК, выделенной из водной толщи и донных осадков.

В ходе выполнения работ, будет получено 105 библиотек ампликонов, из них 36 библиотек – фрагментов генов V3-V4 16S рРНК эубактерий; 17 библиотеки - фрагментов генов V2-V3 16S рРНК архей; 52 библиотеки - фрагментов генов V8-V9 18S рРНК эукариот. В настоящее время в рамках исполнения Контракта ООО “Генотек” ведется подготовительный этап работ.

5 Реконструкция полных геномов выделенных в культуры перспективных для практического применения штаммов бактерий

Выделены и охарактеризованы анаэробные термофильные бактерии рода *Geobacillus*. Штаммы выделены из донных осадков разных районов, включая метановый сип Посольская банка, грязевые вулканы Маленький и Кукуйского каньона во время экспедиции в июле 2013-2015 гг. Пробы осадка отбирали с соблюдением стерильности. Посев производился на питательные среды и помещался в термостат при T +65 °C. Принадлежность штаммов к роду *Geobacillus* установлена на основе фенотипических, физиолого-биохимических характеристик и структуры гена 16S рРНК. В таблице 4 даны координаты отобранных станций, их глубины, характеристика осадка, а также типы пробоотборников.

Таблица 4 – Характеристика станций пробоотбора

станция/ глубина водной толщи, м	Пробоотборник	Координаты	Характеристика осадка в слое, где были выделены штаммы
2013 грязевой вулкан «К-2», Кукуйский каньон, 940 м, Центральная котловина	*GC-3	52,589683°N 106,770733°E	40 см восстановленный диатомовый алеврито-пелитовый ил, серого цвета, газонасыщенный
2015 влк «Маленький», 1371 м, Южная котловина	GC-1	51,91999°N 105,63476°E	15-16 см алеврито-пелитовый диатомовый ил, серого цвета, насыщен гидротроилитом
2015 Посольская банка, 478 м., метановый сип	**BC-7	52,03550°N 105,84317°E	0-5 см алеврито-пелитовый диатомовый ил серого цвета с многочисленными включениями гидротроилита. В отложениях присутствуют следы дегазации.

* GC- гравитационная трубка

** BC – коробчатый пробоотборник (грейфер)

Условия культивирования: Для получения накопительных культур брали 0,5 г осадка, помещали в 50 мл жидкой среды и тщательно перемешивали, затем из анаэробной болтушки отбирали 3 мл и добавляли в 30 мл среды. Использовали модифицированную среду Видделя для пресноводных форм бактерий [20], которая содержит полный набор витаминов и дрожжевой экстракт (0,5 г/л). В качестве восстановителя добавляли сульфид натрия (2,5 мМ). Этот же состав среды использовали для поддержания накопительных культур бактерий. Культивирование осуществляли в течение 30 суток, при температуре 60 °C. В качестве контроля служили флаконы с незасеянной средой. Изолирование культур *Geobacillus* из осадка

вели путем последовательных пересевов с последующим выделением колоний на среде Виделя с добавлением агара – 12 г/ л. Выращивали посевы в термостате при температуре 60 °С. В дальнейшем культуры поддерживали на модифицированной среде Лурия-Бертани (г/ л): KNO₃ - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,5; триптон или пептон - 1,0; агар - 10,0; гилрит - 4,0; pH = 7,2-7,8)

Морфология бактерий исследована с помощью эпифлуоресцентного микроскопа “AxioImager M1”(Carl Zeiss) и сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 (FEI Company, США) с ускоряющим напряжением в 20 киловольт на базе ЦКП “Ультрамикрoанализ”. В первом случае бактерии окрашивали ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол) в рабочей концентрации 10 мкг/мл в течение 5–8 мин при комнатной температуре. Во втором, суспензию клеток фиксировали 4 % раствором параформальдегида в 0,066 М буфере Соренсена при комнатной температуре в течение ночи. Далее клетки отфильтровывали на поликарбонатные фильтры (диаметр пор 0,2 мкм) и проводили обезвоживание в серии растворов этанола (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %) и ацетоне (100 %). Затем проводили сушку в критической точке на приборе CPD 030 Critical Point Dryer (BalzersUnion, Лихтенштейн). Фильтры были помещены на алюминиевые столики и напылены золотом на установке SCD 004 (BalzersUnion, Лихтенштейн).

Анализ последовательностей гена 16S рРНК. Выделение ДНК проводили по модифицированной методике ферментативного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией [21]. Амплификацию ДНК проводили в следующем режиме: 94 °С - 2 мин (1 цикл); денатурация – 94 °С - 45 сек, отжиг – 52 °С - 45 сек, элонгация - 72°С - 60 сек (30 циклов); финальная элонгация – 72 °С - 10 мин (1 цикл). В работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК: 27L- AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG, 1350R- GACGGGCGGTGTGTACAAG [22, 23]. Секвенирование проводили на геномном анализаторе ABI 3130XL Genetic Analyser («Applied Biosystems») с использованием реактива BigDye Terminator Kit v.3.1 (Applied Biosystems) в ЦКП «Геномика», Новосибирск. Последовательности, полученные в результате секвенирования, сравнивали с последовательностями из международного банка данных NCBI с помощью программы BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Структуры были проанализированы с использованием программы ClustalW V 1.4 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Сравнение последовательностей и построение филогенетических древ осуществляли с помощью пакета программ MEGA (<http://www.megafile.co>) с использованием алгоритмов группирования «Neighbor-Joining», модели «Kimura-2-parameters». Статистическая достоверность ветв-

ления оценивалась с помощью "bootstrap-анализа", с использованием соответствующей функции той же программы.

Морфология клеток исследованных штаммов представлена одиночными длинными прямыми или слегка изогнутыми палочками (рисунок 28). Деление с образованием перетяжек (бинарное деление). Клетки при окраске по Граму – положительные. Организмы образуют споры, имеющие овальную форму. В клетке споры локализованы терминально. Культуры терморезистентные. Споры выдерживают прогрев при 100°C в течение 5 мин. При росте на жидкой среде наблюдается однородное помутнение среды с образованием рыхлого осадка в конце роста. Штамм **PB15** подвижен за счёт перитрихально расположенных жгутиков, а штаммы **M15**, **G3**, **G4** неподвижны. На плотной среде (модифицированная среда LB) штаммы образуют колонии округлой формы с ровным краем, лишённые пигмента (**PB15**, **M15**), либо имеют светло-бежевую пигментацию (**G3**, **G4**), слизистой консистенции, однородной структуры.

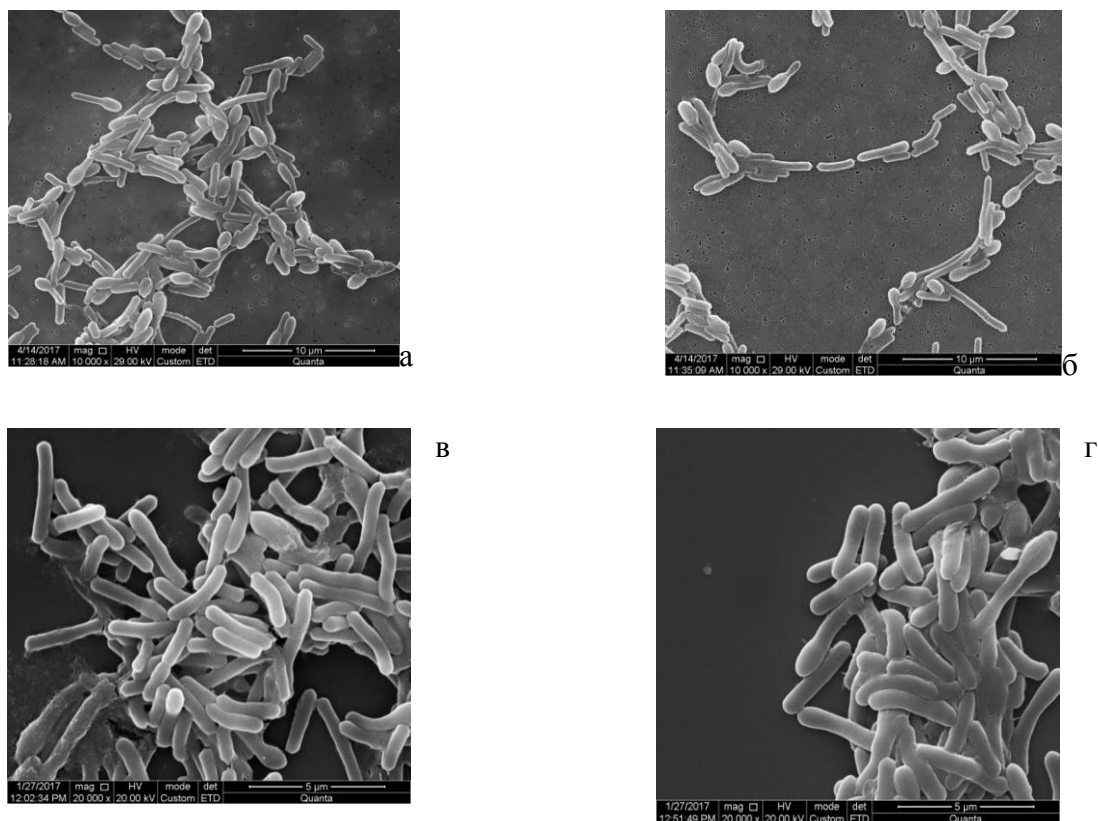


Рисунок 28 – Морфология клеток штаммов: а- PB15; б- M15; в- G3; д- G4

Физиологические свойства. Штаммы термофильные, оптимум роста – 55–60 °С. Верхняя граница роста – 80 °С, нижняя – 46 °С. Штаммы пресноводные поэтому максимум роста наблюдали в среде при отсутствии хлорида натрия. Штаммы **PB15**, **M15** росли в интервале 0–1.5 % NaCl, а **G3**, **G4**–до 2,5 %. Все штаммы нейтрофильны. Область pH для роста 6.8–8.2, с оптимумом 7.0–7.2. При росте штаммы нуждаются в нитрате (нитрат калия). Каталазоположительные. Оксидазоотрицательные. В аэробных условиях в качестве источника энергии и углерода использует глюкозу, фруктозу, рамнозу, маннозу, мальтозу, сахарозу. Растут на агаре с эскулином, гидролизуют крахмал. Для роста необходимы дрожжевой экстракт и витамины. Не используют ксилозу, арабинозу, лактозу, рафинозу, салицин, сорбит, инозит, дульцит, адонит, цитрат, ацетат, малонат натрия, пируват, сукцинат лактат, мочевины, желатину, метанол, этанол, бутанол, пропанол.

Филогенетический анализ. Для того чтобы уточнить таксономическое положение исследованных штаммов, проведено сравнение последовательностей с известными представителями фенотипических групп термофильных *Geobacillus*. В работе использовали последовательности типовых штаммов (валидно описанных), представителей этого рода: *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermodenitrificans*, *G. stearothermophilus* и *G. thermoglucosidasius*, которые являются одними из 15 официально зарегистрированных видов *Geobacillus* [24], а также последовательности штаммов *Parageobacillus toebii* B-1024, *Geobacillus gargensis* Ga^T, выделенных в районах горячих источников Байкальской рифтовой зоны (рис. 29). Родовые названия штаммов приведены с учетом ревизии этого рода [25]. На филогенетическом древе все последовательности ложатся в один кластер, “*Geobacillus thermoleovorans* group”, который объединяет в себе истинных геобацилл. Уровень сходства последовательностей гена 16S рРНК штаммов **PB15**, **M15**, **G3** – 99 %, а идентичность штамма **G4** и других последовательностей этого кластера не превышает 97 %. Штаммы из района Посольской банки и Кукуйского каньона ближе к *G. thermoleovorans* а штамм **M15** к *G. kaustophilus*. Из двух штаммов выделена ДНК (штаммы G4 и Pb15) и передана для полногеномного секвенирования.

6 Структура бактериальных сообществ фотического слоя озера Байкал в весенний, летний и осенний периоды 2017 г. по данным NGS

Краткий результат главы. С помощью NGS секвенирования фрагментов генов 16S рРНК выявлено богатство (в общем 1166 ОТЕ с 97% сходства) и разнообразие бактериальных сообществ фотического слоя (0-25 м) трех котловин озера Байкал, заливов и пролива весной, летом и осенью.

6.1 Материалы и методы

Для исследования бактериальных сообществ в пелагиали озера Байкал были отобраны пробы в южной (Маритуй-Солзан – SMS; Листвянка-Танхой – SLT), средней (Красный Яр – Харауз – МКKh; Ухан-Тонкий – MUT), северной (Елохин-Давша – NED; Байкальское-Турали – NBT) котловинах, Чивыркуйском (ChB) и Баргузинском (BB) заливах и проливе Малое море (ММ) в течение трех экспедиций в весенний (27/05-5/06), летний (18/07-26/07) и осенний (2/09-8/09) периоды. Из отобранных проб была выделена суммарная ДНК и затем проведена амплификация региона V3-V4 гена 16S рРНК и последующее высокопроизводительное секвенирование (NGS) этих фрагментов генов на Illumina. Анализ прочтений, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Usearch v. 10 [26]. Парные прочтения региона V3-V4 16S рРНК были объединены и проведены фильтрация прочтений и дальнейший анализ согласно tutorial для Usearch. Количество прочтений в образцах было нормализовано. Таксономию определяли с помощью Syntax в Usearch [27]. Референсной базой данных для Syntax была rdp_16s_v16.fa.

6.2 Результаты

В результате было получено в среднем 70100 прочтений на образец со средней длиной прочтений 446 нуклеотидов (таблица 5). Общее количество прочтений в 27 образцах составляло 1892698. Количество операционных таксономических единиц (ОТЕ) в разных котловинах и по сезонам варьировало от 318 до 570 (таблица 5). Для всех образцов графики зависимости количества ОТЕ от количества прочтений выходят на плато (рисунок 29). Это показывает, что количество прочтений, полученных в результате секвенирования достаточно для охвата всего богатства бактериальных сообществ. Разнообразие по индексу Shannon_e среди всех образцов было выше в заливах (BB, ChB). Наименьшее разнообразие бактериальных сообществ по индексу Shannon_e было в осенний период (2/09-8/09), в сравнении с весной (27/05-5/06) и летом (18/07-26/07) (таблица 5). Индекс Simpson выше у осенних сообществ,

что подтверждает их наименьшее разнообразие в сравнении с сообществами других сезонов (таблица 5). Индекс Chao1 был похож на количество ОТЕ (рисунок 29), следовательно, мы охватили все богатство ОТЕ в пробах (таблица 5).

Состав бактериальных сообществ трех котловин и трех сезонов (весна, лето, осень), в основном был представлен Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Firmicutes, Acidobacteria (рисунок 30). В весенний период было наибольшее соотношение Actinobacteria, Bacteroidetes, Betaproteobacteria в сообществах, в сравнении с другими сезонами (рисунок 30). От весны к осени увеличивается соотношение Cyanobacteria в сообществах (рисунок 30).

Таким образом, было показано, что в фотическом слое (0-25 м) различных котловин озера Байкал в ходе трех сезонов от весны к осени в бактериальных сообществах снижается соотношение Actinobacteria, Bacteroidetes и Betaproteobacteria и увеличивается соотношение Cyanobacteria.

Кластерный анализ для ОТЕ (97% сходства) бактериальных сообществ, построенный с использованием метрики UniFrac показал, что большинство сообществ формируют один общий кластер (рисунок 31). В пределах большого кластера были подкластеры бактериальных сообществ весны, осени и весны-лета. С сообществами весны кластеризовались некоторые из сообщества лета, и с другими летними сообществами кластеризовались сообщества осени (рисунок 31).

Таблица 5 – Количество прочтений, богатство и разнообразие для ОТЕ (97% сходства) бактерий в пробах фотического слоя (0-25 м) озера Байкал весной, летом и осенью.

Код об-разцов	Образцы	Количество прочтений	Количество ОТЕ (97% сходства)	Chao1	Simpson	Shannon_e
BD1	SMS_27/05	70088	414	414	0.0473	3.91
BD27	SLT_27/05	70120	484	484	0.0539	3.91
BD7	MKKh_29/05	70060	402	402	0.066	3.55
BD2	MUT_30/05	70134	409	409	0.0394	4.02
BD3	NED_1/06	70096	386	386	0.0615	3.58
BD4	NBT_2/06	70120	321	321	0.091	3.34
BD8	BB_31/05	70068	431	431	0.0335	4.09
BD6	ChB_4/06	70077	404	404	0.0238	4.27
BD5	MM_5/06	70138	402	402	0.0445	3.89
BD9	SMS_18/07	70081	348	348	0.0695	3.42
BD30	SLT_19/07	70092	371	371	0.0581	3.64
BD15	MKKh_21/07	70116	500	503.1	0.0909	3.34
BD10	MUT_26/07	70091	332	333.8	0.0665	3.35
BD11	NED_22/07	70059	394	395.8	0.0661	3.69
BD12	NBT_23/09	70068	367	368.3	0.113	3.32
BD16	BB_25/07	70147	505	506	0.0651	3.65
BD13	MM_22/07	70137	416	420	0.158	2.71
BD14	ChB_25/07	70119	412	412.4	0.0986	3.03
BD17	SMS_2/09	70127	402	404.7	0.289	1.97
BD32	SLT_3/09	70127	318	321.5	0.316	1.81
BD23	MKKh_4/09	70151	433	434.1	0.166	2.64
BD18	MUT_11/09	70115	557	560	0.179	2.79
BD19	NED_7/09	70126	414	416	0.23	2.44
BD20	NBT_7/09	69978	390	392.9	0.252	2.33
BD21	MM_5/09	70121	453	453.6	0.179	2.78
BD22	ChB_8/09	70064	570	570.4	0.0673	3.78
BD24	BB_8/09	70078	462	462.9	0.054	3.69

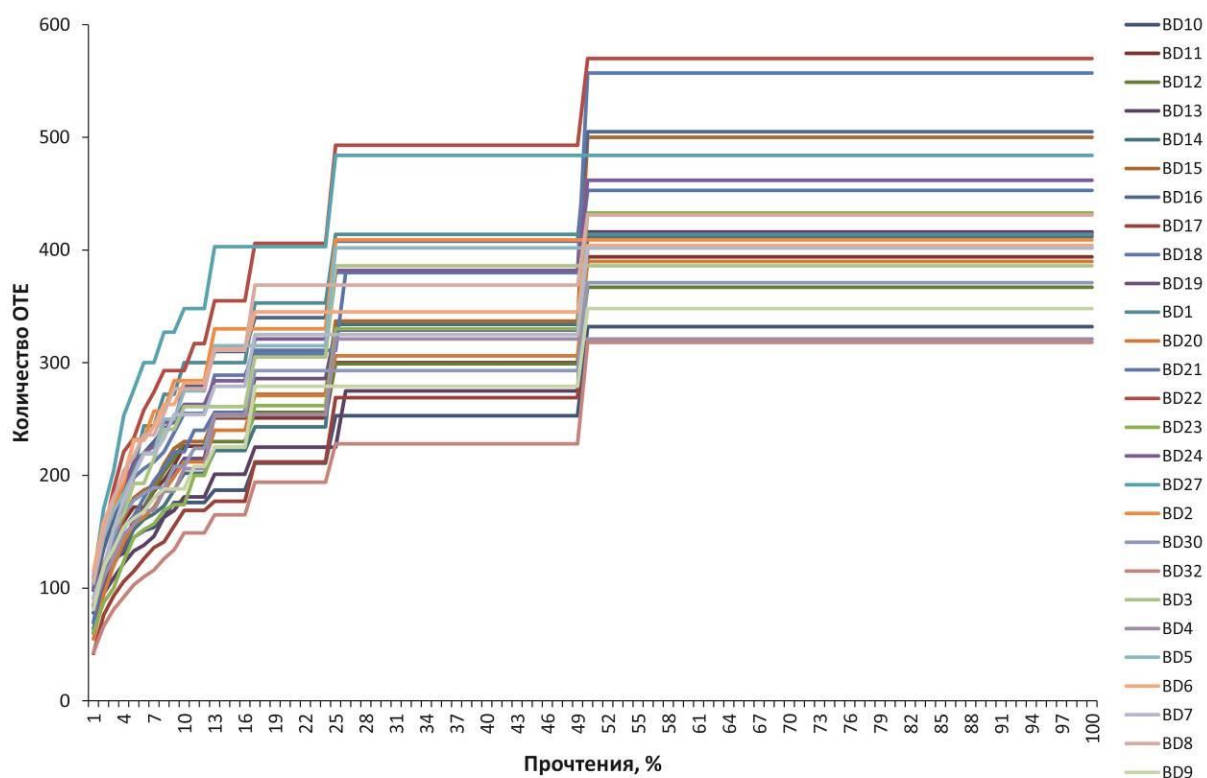


Рисунок 29 – Графики разрежения (rarefaction) прочтений 16S рРНК для 27 образцов из фотического слоя озера Байкал 2017 г.

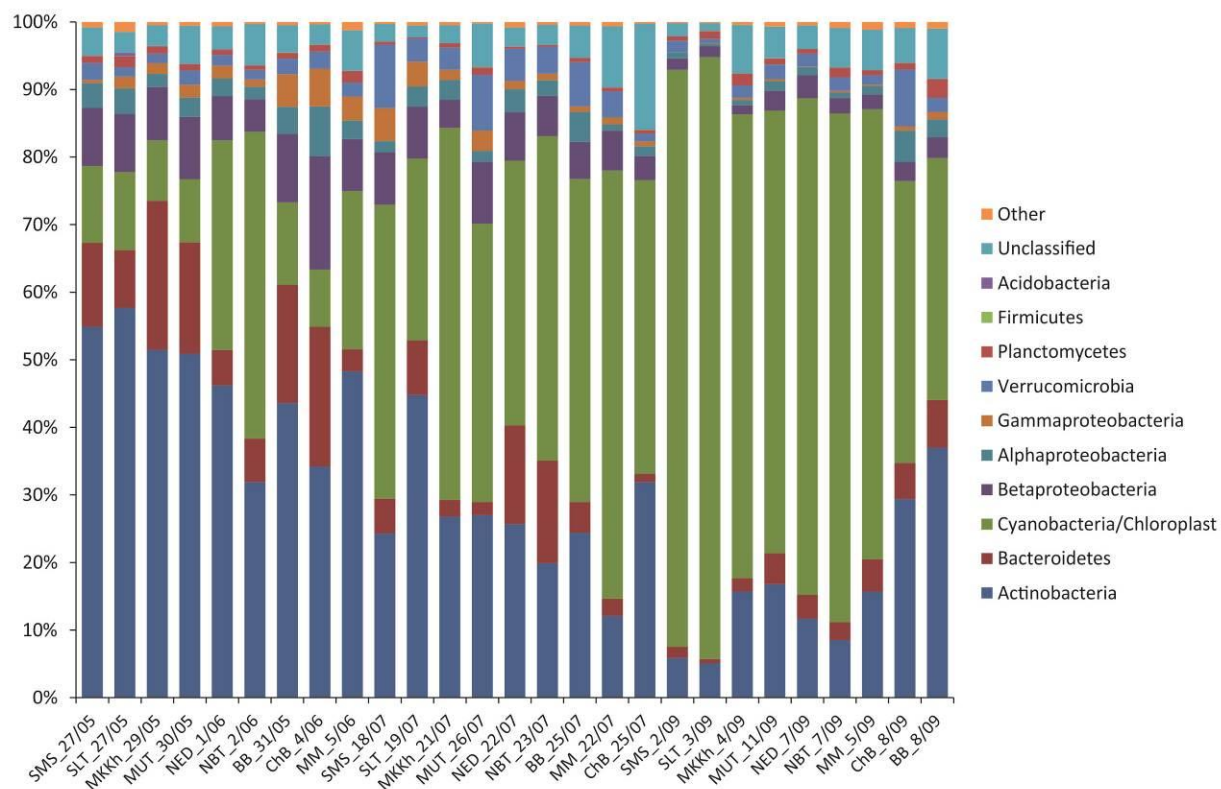


Рисунок 30 – Соотношение прочтений Bacteria в образцах фотического слоя озера Байкал весной (27/05-5/06), летом (18/07-26/07) и осенью (2/09-8/09)

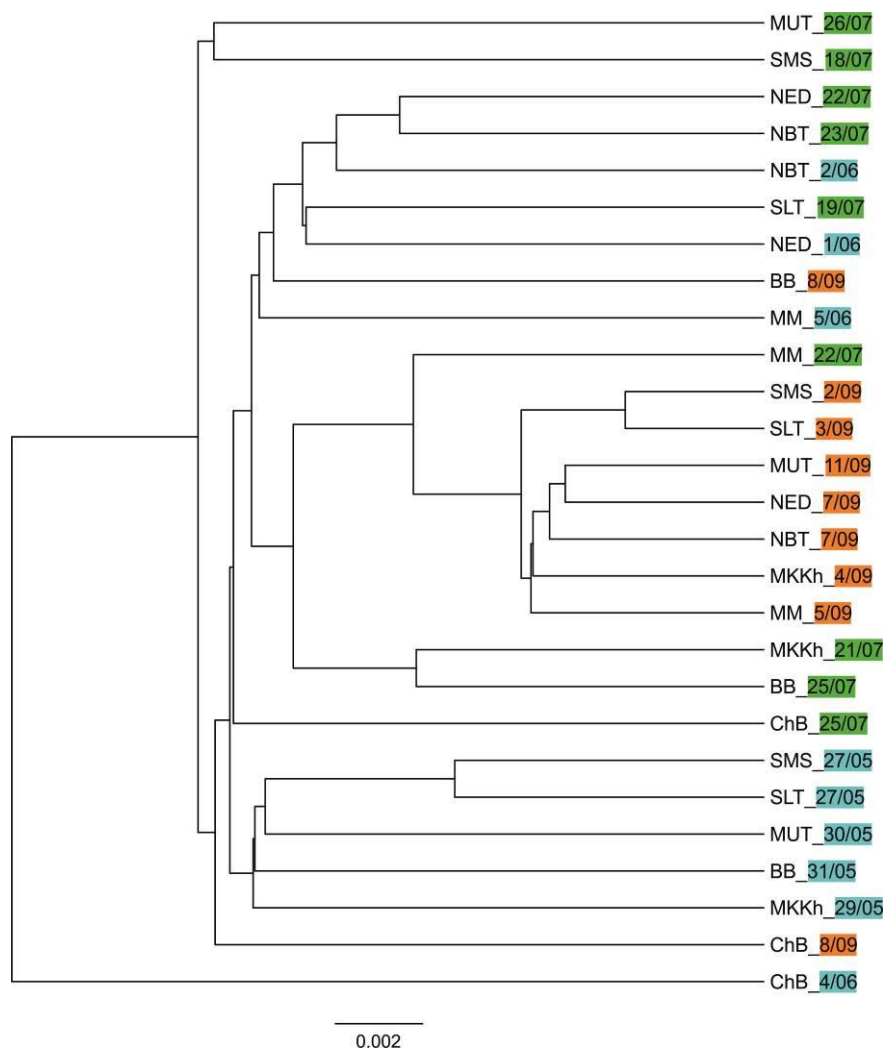


Рисунок 31 – Кластерный анализ для ОТЕ (97% сходства) бактериальных сообществ, построенный с использованием метрики UniFrac. Синим отмечены сообщества весны; зеленым – сообщества лета

7 Сукцессия сообществ бактерий и микроэукариот в южной котловине озера Байкал в 2017 г. по данным NGS

Краткий результат главы. От весны к осени в бактериальных сообществах снижалась доля представителей Actinobacteria, Bacteroidetes и Betaproteobacteria и увеличивалась доля Cyanobacteria. С марта по сентябрь фотическом слое пелагической станции южной котловины Байкала происходила сезонная смена сообществ микроэукариот. В общем выявлено 424 ОТЕ (97 % сходства) микроэукариот. Весной выявлены наибольшая доля Diatomeae (диатомеи) и паразитов эукариот Cryptomycota. У гетеротрофных Ciliophora не было резкого изменения доли по сезонам. Chrysophyceae имели наибольшую долю весной после вскрытия озера ото льда и осенью.

7.1 Материалы и методы

На пелагической станции южной котловины озера Байкал была исследована сукцессия (смена сообществ во времени) сообществ бактерий и микроэукариот. Были отобраны пробы в 8 временных точках с марта по сентябрь. В марте и апреле пробы отбирали со льда, в другие месяцы с НИС «Г.Ю. Верещагин» и НИС «Академик Коптюг». На станции Листвянка-Танхой в 2017 температура воды увеличивалась от весны (0.4 °C) к лету (9.78 °C), затем снижалась осенью (7.09 °C) (таблица 6). Данные температуры в ледовый период были измерены самостоятельно и в дальнейшие сезоны получены сотрудниками лаборатории гидрологии и гидрофизики ЛИН СО РАН. В марте толщина льда составляла 63 см, заснеженность 100% и толщина снега 4 см. В апреле толщина льда составляла 57 см и снег отсутствовал. Концентрации Si, PO₄³⁻, P общ н/фильтр, NO₃⁻ были выше в период весенней гомотермии 27.05 и 6.06 (таблица 6). Концентрации Si снижались летом (10/07, 19/07) и затем повышались осенью (3/09, 14/09) (таблица 6).

Таблица 6 – Средние значения параметров среды в верхнем 0-25 м слое на станции Листвянка-Танхой с марта по сентябрь 2017 г.

Дата	Время	T, °C	pH	Si, мг/л	PO ₄ ³⁻ , мг/л	P общ н/ф-р, mg/L	NO ₂ ⁻ , мг/л	NO ₃ ⁻ , мг/л	NH ₄ ⁺ , мг/л
29.03.2017	13.30	0.4	8.09	0.37	0.013	0.009	0.005	0.23	0.013
12.04.2017	13.00	0.8	8.00	0.31	0.014	0.012	0.005	0.34	0.004
27.05.2017	14.00	3.6	8.01	0.54	0.024	0.013	0.001	0.46	0.001
06.06.2017	10.30	3.7	8.00	0.49	0.026	0.013	0.001	0.54	0.000
10.07.2017	14.00	-	-	0.14	0.015	-	0.003	0.26	0.006
19.07.2017	4.20	9.78	-	0.19	0.014	0.007	0.002	0.19	0.002
3.09.2017	7.10	7.3	8.06	0.37	0.010	0.011	0.007	0.30	0.004
14.09.2017	2.10	7.09	8.05	0.32	0.019	0.011	0.003	0.19	0.004

7.2 Результаты

В весенний подледный период (29/03, 12/04) были наибольшие численность и биомасса фитопланктона (529×10^3 кл./л, 441×10^3 кл./л, и 568 мг/м^3 , 466 мг/м^3 , соответственно) в сравнении с другими сезонами и доминирующими по биомассе были хризифитовая *Dinobryon cylindricum* O.E.Imhof (29/03) и диатомея *Fragilaria radians* (Kützing) D.M.Williams & Round (= *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabichevskii) (12/04) (рисунок 31). *F. radians* доминировала по биомассе с весны до лета (12/04-19/07) (рисунок 31 В). Центрическая диатомея *Cyclotella baicalensis* Skvortzov and Meyer доминировала по биомассе осенью (14/09). Динофлагелляты *Gymnodinium baicalense* Antipova и *Peridinium baicalense* Kiselev and Zvetkov выявлены только в подледный период (рисунок 31 В). Зеленая мелкоклеточная микроводоросль *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová (3/09) доминировала по численности в подледный период (29/03, 12/04), летом и осенью (10/07-14/09) (рисунок 31 А).

Параллельно в тех же пробах исследована сукцессия бактериальных сообществ. Парные прочтения V3-V4 16S рРНК, полученные в результате секвенирования, были объединены и проанализированы в программе Usearch. В результате было получено в среднем 50000 прочтений на образец со средней длиной прочтений 446 нуклеотидов (таблица 7). Общее количество прочтений в 9 образцах составляло 450032. Для всех образцов графики зависимости количества ОТЕ от количества прочтений выходят на плато (рисунок 32) и индекс Chao1 сходен с количеством ОТЕ, это подтверждает, что было охвачено все богатство ОТЕ в пробах (таблица 7). Количество ОТЕ в образцах варьировало от 276 до 444 (таблица 7).

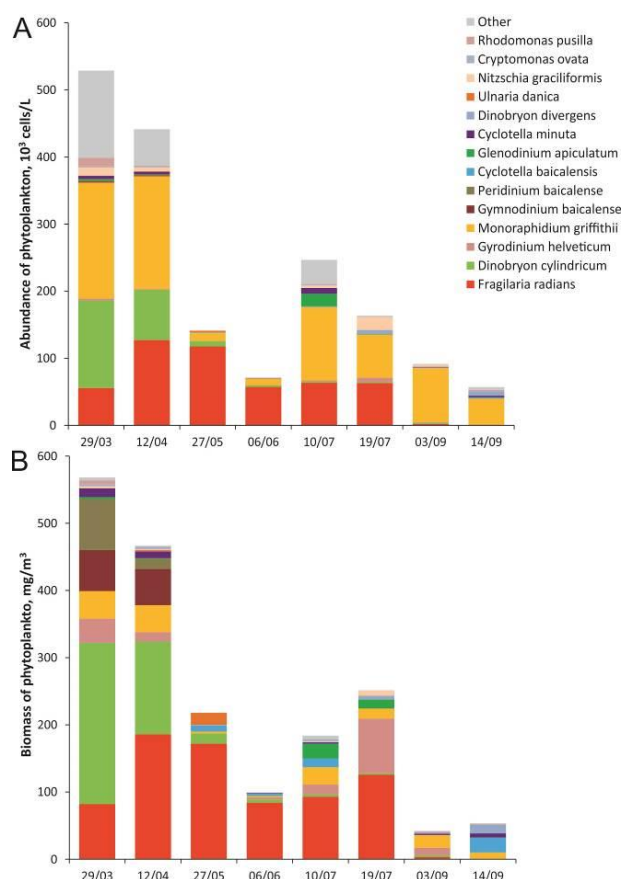


Рисунок 31 –Динамика численности и биомассы фитопланктона в верхнем 0-25 м слое на станции Листвянка-Танхой с марта по сентябрь 2017

Таблица 7 – Количество прочтений, богатство и разнообразие для ОТЕ (97% сходства) бактерий в образцах фотического слоя (0-25 м) на станции Листвянка-Танхой в озере Байкал с марта по сентябрь.

Код образцов	Образцы	Количество прочтений	Количество ОТЕ (97 % сходства)	Chao1	Simpson	Shannon_e
BD25	29/03	50005	278	278	0.0639	3.59
BD26	12/04	50000	295	295	0.0576	3.64
BD27	27/05	50016	440	440	0.0563	3.85
BD28	6/06	49961	444	444.5	0.0581	3.83
BD29	10/07	49982	315	316.2	0.0496	3.7
BD30	19/07	50024	317	317.8	0.0644	3.52
BD31	3/09 (пол.)	50020	339	339.2	0.201	2.64
BD32	3/09 (цел.)	50007	276	283.4	0.334	1.75
BD33	14/09	50017	368	379.7	0.147	3.05

Разнообразие по индексу Shannon_e было ниже и индекс Simpson выше в осенних образцах (3/09, 14/09), что подтверждает их наименьшее разнообразие в сравнении с сообществами других сезонов (таблица 7). Было отобрано два образца 3/09, которые фильтровали на поликарбонатные (пол.) 0.2 мкм фильтры и целлюлозные (цел.) 0.2 мкм фильтры (таблица 7). В образце, профильтрованном через поликарбонатный фильтр, было выше богатство и разнообразие (таблица 7), поэтому лучше использовать этот фильтр для исследования бактериальных сообществ.

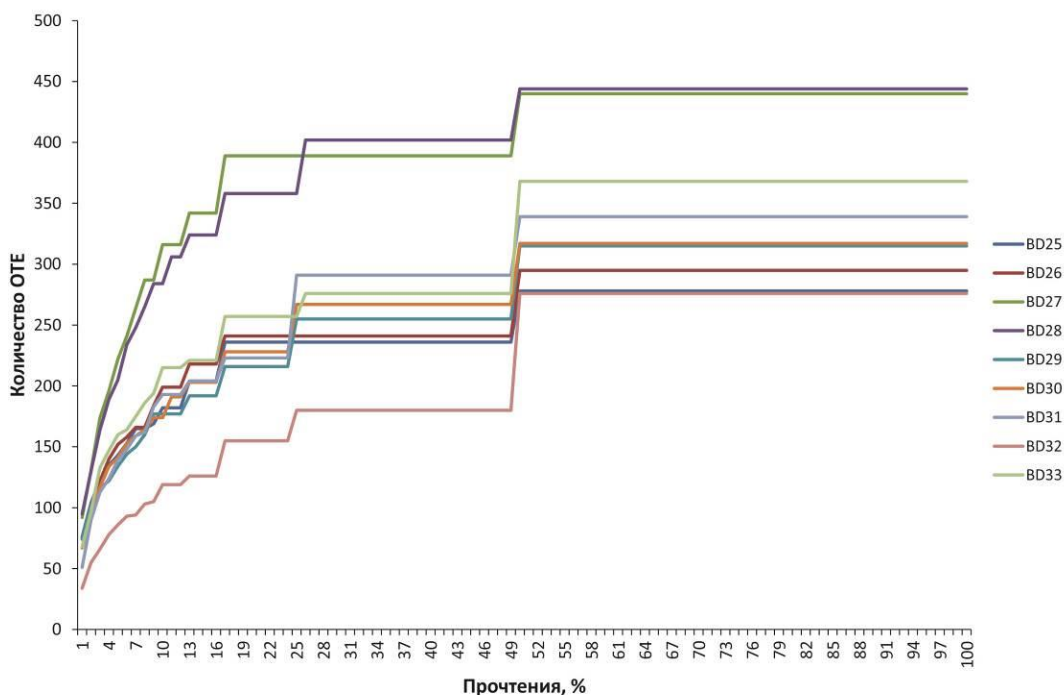


Рисунок 32 – Графики разряжения прочтений V3-V4 16S рРНК для 9 образцов из фотического слоя станции Листвянка-Танхой в озере Байкал в 2017 г.

Состав бактериальных сообществ на станции Листвянка-Танхой был представлен Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Acidobacteria (рисунок 33). Весной и летом был сходный состав сообществ с доминированием Actinobacteria (45-59% от общего количества прочтений в образце). Осенью доминирующим филумом становился Cyanobacteria (58-89%) (рисунок 33).

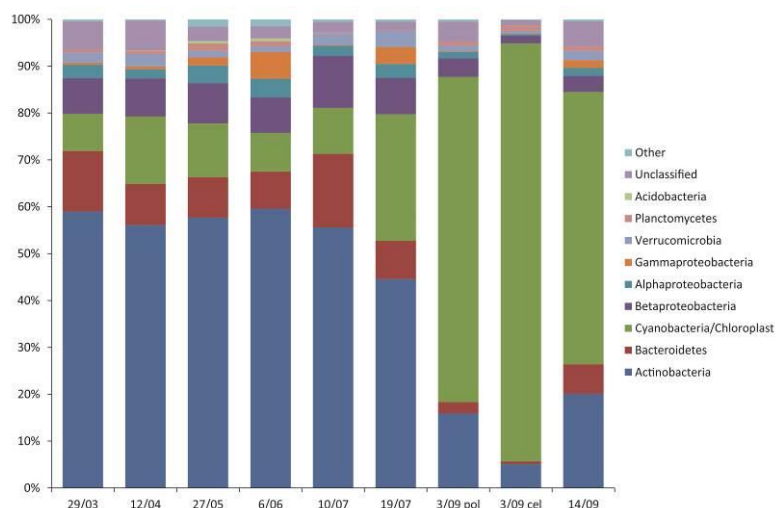


Рисунок 33 – Соотношение прочтений Bacteria в образцах фотического слоя станции Листвянка-Танхой в озере Байкал с марта по сентябрь

Кластерный анализ с использованием метрики UniFrac показал, что бактериальные сообщества формируют два кластера. В первый входят сообщества весны и лета, во второй – осени (рисунок 34).

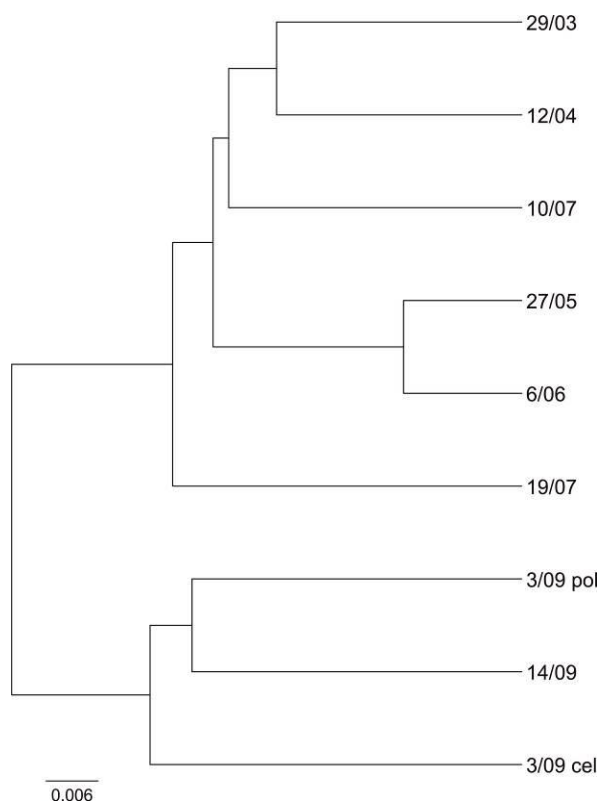


Рисунок 34 – Кластерный анализ для ОТЕ (97% сходства) бактериальных сообществ, построенный с использованием метрики UniFrac

Анализ данных NGS выявил сукцессию сообществ микроэукариот. Парные прочтения региона V4 гена 18S рРНК эукариот объединены и проанализированы в программе Usearch. В результате было получено в среднем 37000 прочтений на образец (таблица 8). Общее количество прочтений для 9 образцов составляло 333003. Для всех образцов графики зависимости количества ОТЕ от количества прочтений выходят на плато (рис. 8) и индекс Chao1 сходен с количеством ОТЕ, таким образом, мы охватили все богатство ОТЕ в пробах (таблица 8). Количество ОТЕ в образцах варьировало от 179 до 239 (таблица 8). Разнообразие по индексу Shannon_e и индекс Simpson были сходны в различные сезоны. В образце, профильтрованном через поликарбонатный фильтр, было выше богатство и разнообразие, по сравнению с использованием целлюлозного фильтра (таблица 8).

Таблица 8 – Количество прочтений, богатство и разнообразие для ОТЕ (97% сходства) микроэукариот (V4 18S рРНК) в образцах фотического слоя (0-25 м) на станции Листвянка-Танхой в озере Байкал с марта по сентябрь 2017.

Код образцов	Образцы	Количество прочтений	Количество ОТЕ (97% сходства)	Chao1	Simpson	Shannon_e
BD25	29/03	37007	184	185.2	0.0616	3.49
BD26	12/04	37011	192	192.3	0.0874	3.21
BD27	27/05	37019	196	196.5	0.121	2.75
BD28	6/06	36986	183	183	0.075	3.16
BD29	10/07	36986	183	183.4	0.0502	3.46
BD30	19/07	36991	194	194.2	0.0448	3.62
BD31	3/09 (пол.)	37010	209	210.9	0.051	3.58
BD32	3/09 (цел.)	36992	179	179.9	0.0581	3.43
BD33	14/09	37001	239	240.5	0.0346	3.88

Парные прочтения V8-V9 18S рРНК эукариот объединены и проанализированы в программе Usearch. Таксономию определяли с помощью Syntax в Usearch [27]. Референсной базой данных для Syntax была silva_18s_v123.fa. В результате было получено в среднем 62000 прочтений на образец (таблица 9) со средней длиной прочтений 367 нуклеотидов. Общее количество прочтений для 9 образцов составляло 558039. Количество ОТЕ (богатство) при анализе сообществ микроэукариот по региону V8-V9 18S рРНК было выше (таблица 9), чем при анализе сообществ по региону V4 18S рРНК (таблица 9).

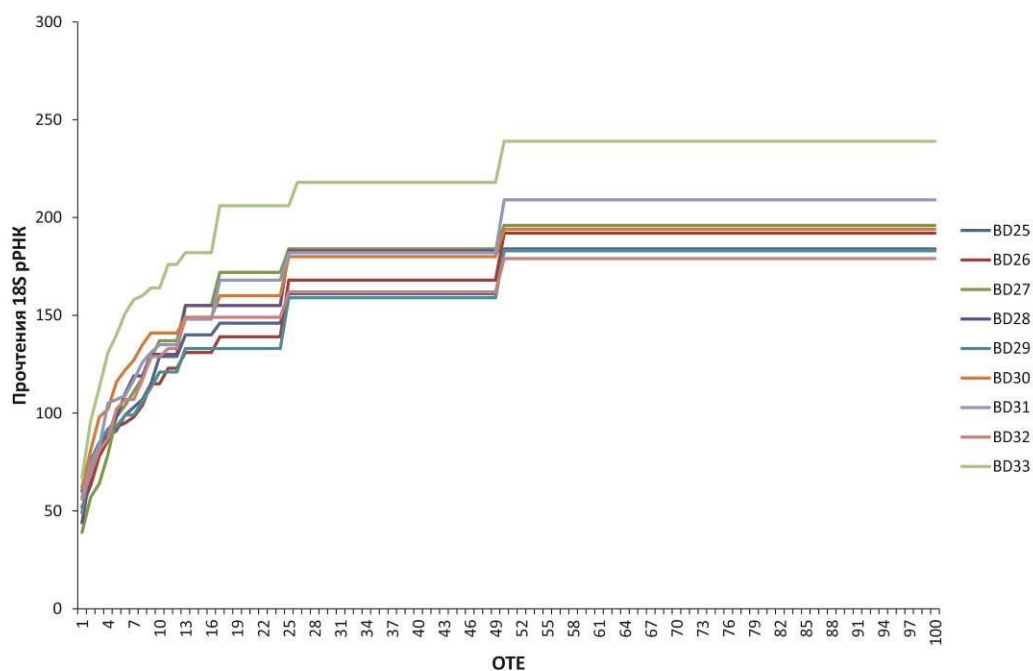


Рисунок 33 – Графики разряжения прочтений региона V4 гена 18S рРНК для 9 образцов из фотического слоя станции Листвянка-Танхой в озере Байкал в 2017 г.

Поэтому в дальнейшем анализ сообществ микроэукариот следует проводить по V8-V9 18S рРНК. Разнообразие сообществ микроэукариот в различных образцах было сходным (таблица 9).

Таблица 9 – Количество прочтений, богатство и разнообразие для ОТЕ (97% сходства) микроэукариот (V8-V9 18S рРНК) в образцах фотического слоя (0-25 м) на станции Листвянка-Танхой в озере Байкал с марта по сентябрь.

Код образцов	Образцы	Количество прочтений	Количество ОТЕ (97% сходства)	Chao1	Simpson	Shannon_e
BD25	29/03	62015	243	243.3	0.0662	3.46
BD26	12/04	62017	225	226.1	0.0618	3.43
BD27	27/05	61985	231	231.3	0.111	2.86
BD28	6/06	62009	226	226	0.0715	3.25
BD29	10/07	62012	224	226.4	0.0556	3.42
BD30	19/07	61990	240	241.3	0.0524	3.54
BD31	3/09 (пол.)	62013	241	242.2	0.0488	3.61
BD32	3/09 (цел.)	61988	179	179	0.0538	3.44
BD33	14/09	62010	235	235.6	0.0387	3.79

Сообщества эукариот были в основном представлены Dinoflagellata, Ciliophora, Chrysophyceae, Diatomeae, Dictyochophyceae, Cryptomonadales, Bicosoecida, Kathablepharidae, Prymnesiophyceae, Cryptomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Cercozoa, Choanoflagellida, Arthropoda, Unassigned Eukaryota (рисунок 34). Соотношение Diatomea было выше в весенний период (12/04-6/06). Chrysophyceae вносили наибольший вклад в состав сообществ весной (27/05) и осенью (3/09, 14/09). Соотношение гетеротрофных Ciliophora в различные сезоны варьировало в пределах от 9% до 24%. Паразитические Cryptomycota имели наибольшее соотношение весной после вскрытия озера ото льда 27/05 и 6/06 и составляли 12% и 8% соответственно (рисунок 34).

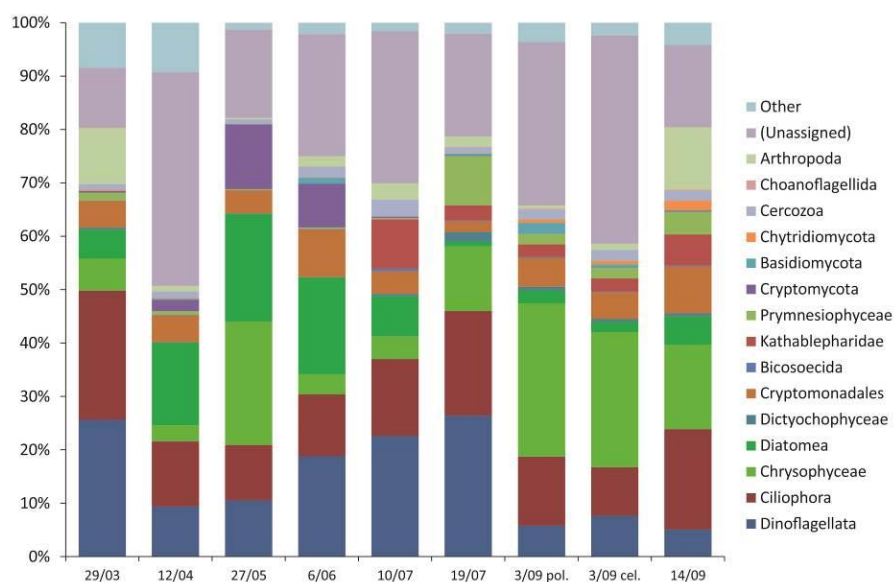


Рисунок 34 – Соотношение прочтений Eukaryota (по V8-V9 18S рРНК) в образцах фотического слоя станции Листвянка-Танхой в озере Байкал с марта по сентябрь

Кластерный анализ с использованием метрики UniFrac показал, что сообщество подледного периода (29/03) было отдельно от большого кластера с сообществами других периодов (рисунок. 35). Большой кластер подразделялся на два подкластера весна с началом лета (10/07) и осень со второй половиной лета (19/07) (рисунок 35).

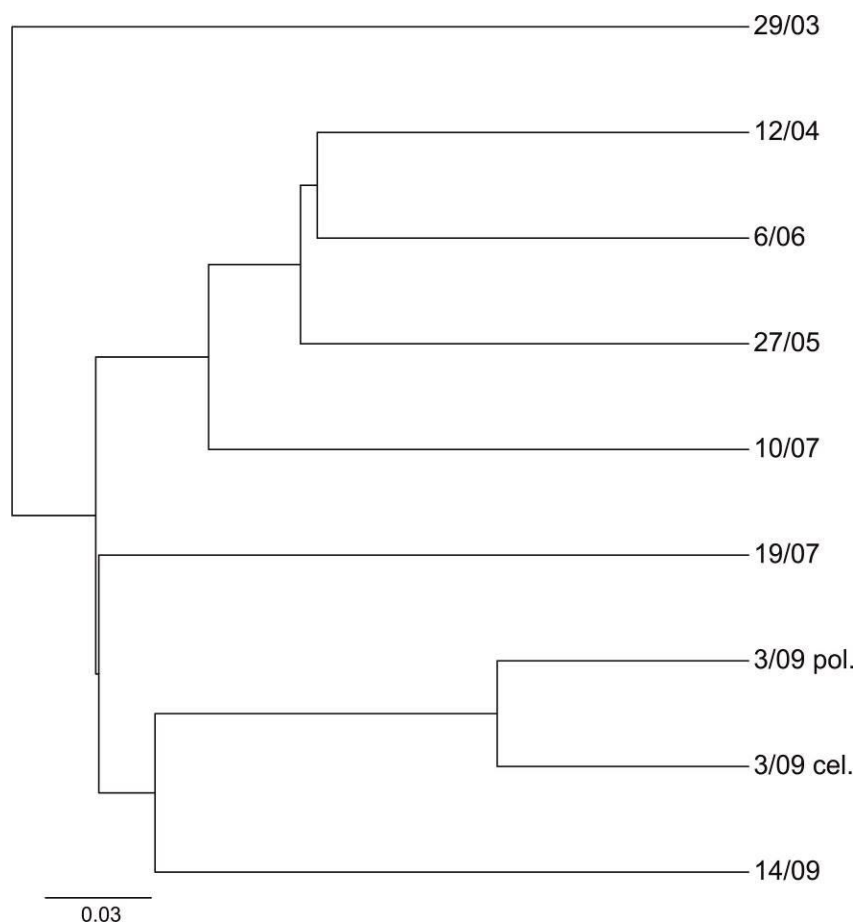


Рисунок 35 – Кластерный анализ для ОТЕ (97% сходства) сообществ микроэукариот (по V8-V9 18S рРНК), построенный с использованием метрики UniFrac

Таким образом, в данной работе была выявлена сукцессия сообществ бактерий и микроэукариот в фотическом слое (0-25 м) пелагической станции южной котловины озера Байкал с марта по сентябрь. В бактериальных сообществах от весны к осени увеличивалось соотношение *Cyanobacteria* и снижалось соотношение других таксонов. В сообществах микроэукариот весной выявлены наибольшие соотношения *Diatomeae* (диатомеи) и паразитов эукариот *Cryptomycota*. У гетеротрофных *Ciliophora* не было резкого изменения соотношения по сезонам. *Chrysophyceae* имели наибольшее соотношение весной после вскрытия озера ото льда и осенью.

Для исследования сообществ бактерий и микроэукариот проводилось NGS секвенирование фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК на платформе Illumina. Полученные прочтения анализировались с помощью программы Usearch, которая работает быстрее и выполняет более строгую фильтрацию данных, чем используемая ранее программа Mothur. Количество

прочтений на образец варьировало от 37000 до 70000. При анализе сообществ бактерий и микроэукариот в пробах фотического слоя озера Байкал, отобранных в 2017 г., в общем было получено 3233772 прочтения.

При анализе бактериальных сообществ 2017 г. было получено 50000-70000 прочтений на образец, что позволило выявить наибольшее богатство (278-557 операционных таксономических единиц – ОТЕ с 97 % сходства) сообществ, чем в нашей работе, выполненной ранее [10], в которой для большинства бактериальных сообществ фотического слоя Байкала среднее количество прочтений составляло 1500 и количество ОТЕ было от 51 до 265, что недостаточно для определения всего богатства бактериальных сообществ. В результате в бактериальных сообществах фотического слоя (0-25 м) трех котловин озера Байкал (6 станций), Баргузинского и Чивыркуйского заливов, и пролива Малое Море за три сезона (весна, лето, осень) выявлено в общем 1166 ОТЕ. От весны к осени в бактериальных сообществах снижалась доля представителей Actinobacteria, Bacteroidetes и Betaproteobacteria и увеличивалась доля Cyanobacteria.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2018 г. для поддержки исследований в метагеномном анализе, который позволяет описывать микробные сообщества с ранее недоступной точностью, на данном этапе разработана система формализованных знаний, позволяющих преобразовывать описания структур модулей анализа NGS в визуальные модели. На основе этих моделей на следующих этапах проекта будут реализованы программы визуального программирования процедур анализа ампликонов, модули обеспечения хранения исходных и промежуточных данных в облачном хранилище, интегрировать процедуры и данных, организованные разными исследованиями, публиковать семантически-размеченные данные в Интернете, а также разрабатываться методики автоматизации проектирования распределенных вычислительных процессов на вычислительных кластерах.

На основе ранее полученных данных секвенирования показано, что наибольшей разрешающей способностью на уровне таксонов низшего ранга (роды, виды) обладает фрагмент, включающий районы V2–V3 16S rRNA. Этот фрагмент позволяет провести более подробное разделение пула нуклеотидных последовательностей на основе генетических дистанций на операционные таксономические единицы (ОТЕ, или OTU) видового ранга. Статистически сходящиеся оценки видового разнообразия для доминирующей части сообщества (пул видов, представляющих 95 % последовательностей) могут быть получены при размерах выборок от 10 000 до 15 000 последовательностей. Относительная ошибка оценок индекса видового разнообразия Шеннона при этом будет менее 4 %.

Для анализа структурно-функциональной организации микробиома разработан алгоритм построения сетей взаимодействия между организмами в сообществах, который позволяет выделить в исследуемой экосистеме ключевые звенья – виды, образующие каркас первичных продуцентов органического вещества и видов его потребителей. Сеть взаимодействий позволяет выделить в основном сообществе с помощью кластеризации группы видов с более тесной связью друг с другом и менее связанные с остальными видами сообщества (структурные подгруппы видов). Анализ сети взаимодействий позволяет перейти к следующему этапу – разработки динамической системы для прогнозирования поведения сообщества и экосистемы оз. Байкал при изменении условий среды.

Проведен анализ данных секвенирования (NGS) проб фотического слоя воды (0-25 м) пелагической станции в южной котловине оз. Байкал (Листвянка-Танхой) с марта по сентябрь 2017 г. (восемь временных точек). При анализе сообществ микроэукариот средняя длина прочтений V8-V9 18S рРНК составила 360 нуклеотидов, среднее количество прочтений на образец – 62 000. Выявленное количество ОТЕ составляет 225-241 на образец, что

превышает недавно опубликованные зарубежными авторами данные (от 15 до 224) для проб, отобранных в южной котловине на различных глубинах в июле 2009 г. [28]. Для всех образцов в бактериальных сообществах выявлено в общей сложности 603 ОТЕ, представляющих отдельные таксоны, и для микроэукариот – 424. Нами впервые методом NGS выявлена сезонная динамика сообществ бактерий и микроэукариот в фотическом слое южной котловины оз. Байкал. Показано, что от весны к осени увеличивается доля *Cyanobacteria* и снижается доля других таксонов. В сообществах микроэукариот в весенний период наибольшая доля от всех полученных для пробы ОТЕ принадлежит диатомовым водорослям, что согласуется с данными микроскопических исследований. Высокая доля ОТЕ паразитов эукариот *Cryptomycota*, которые другими методами в каком разнообразии ранее не выявлялись. Доля гетеротрофных *Ciliophora* по сезонам существенно не изменяется. Хризофитовые вносят наибольший вклад в состав сообществ весной после вскрытия озера ото льда и осенью, что согласуется с данными, полученными нами ранее с помощью микроскопического анализа [29, 30]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности NGS для исследований экосистемы оз. Байкал.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Karsenti E., Acinas S.G., Bork P., Bowler C., De Vargas C., Raes J., Sullivan M., Arendt D., Benzoni F., Claverie J.M., Follows M., Gorsky G., Hingamp P., Iudicone D., Jaillon O., Kandels-Lewis S., Krzic U., Not F., Ogata H., Pesant S., Reynaud E.G., Sardet C., Sieracki M.E., Speich S., Velayoudon D., Weissenbach J., Wincker P. A holistic approach to marine eco-systems biology // *PLoS Biol.* – 2011. – Vol. 9. – № 10. – P. e1001177.
- 2 Karsenti E. Towards an ‘Oceans Systems Biology’ // *Mol. Syst. Biol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 575.
- 3 Gilber J.A. Steele J.A., Caporaso J.G., Steinbrück L., Reeder J., Temperton B., Huse S., McHardy A.C., Knight R., Joint I., Somerfield P., Fuhrman J.A., Field D. Defining seasonal marine microbial community dynamics // *ISME J.* – 2012. – Vol. 6. – P. 298–308.
- 4 Steele J.A., Countway P.D., Xia L., Vigil P.D., Beman J.M., Kim D.Y., Chow C.E., Sachdeva R., Jones A.C., Schwalbach M.S., Rose J.M., Hewson I., Patel A., Sun F., Caron D.A., Fuhrman J.A. Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages // *ISME J.* – 2011. – Vol. 5. – P. 1414–1425.
- 5 Dam P., Fonseca L.L., Konstantinidis K.T., Voit E.O. Dynamic models of the complex microbial metapopulation of Lake Mendota // *Syst. Biol. Appl.* – 2016. – Vol. 2. – P.16007.
- 6 Cardona C., Weisenhorn P., Henry C., Gilbert J.A. Network-based metabolic analysis and microbial community modeling // *Curr. Opinion Microbiol.* – 2016. – Vol. 31. – P. 124–131.
- 7 Johns N.I. Blazejewski T., Gomes A.L., Wang H.H. Principles for designing synthetic microbial communities // *Curr. Opinion Microbiol.* – 2016. – Vol. 31. – P. 146–153.
- 8 Csardi G., Nepusz T. The igraph software package for complex network research // *Inter-Journal, Complex Systems.* – 2006. – № 1695. – P. 1–9.
- 9 Epskamp S., Cramer A. O., Waldorp L.J., Schmittmann V.D., Borsboom D. qgraph: Network visualizations of relationships in psychometric data // *Journal of Statistical Software.* – 2012. – № 48. – P. 1–18.
- 10 Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Bukin Y. S., Galachyants Y.P., Petrova D.P., Sakirko, M.V., Likhoshway, Y.V. Co-occurrence networks among bacteria and microbial eukaryotes of Lake Baikal during a spring phytoplankton bloom // *Microbial Ecology.* – 2018. – P. 1-14.
- 11 Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Sahl J.W. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Applied and environmental microbiology.* – 2009. – №75. – P. 7537–7541.

- 12 Amin S.A., Hmelo L.R., van Tol H.M., Durham B.P., Carlson L.T., Heal K.R., Morales R.L., Berthiaume C.T., Parker M.S., Djunaedi B., Ingalls A.E., Parsek M.R., Moran M.A., Armbrust E.V. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. // Nature. – 2015. – Vol. 522(7554). P. 98–101.
- 13 Teeling H., Fuchs B.M., Becher D., Klockow C., Gardebrecht A., Bennke C.M., Kassabgy M., Huang S., Mann A.J., Waldmann J., Weber M., Klindworth A., Otto A., Lange J., Bernhardt J., Reinsch C., Hecker M., Peplies J., Bockelmann F.D., Callies U., Gerdtz G., Wichels A., Wiltshire K.H., Glöckner F.O., Schweder T., Amann R. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom // Science. – 2012. – Vol. 366 (6081). – P. 608–611.
- 14 Gerhardt P., Costilow R., Krieg N.R., Murrey R.G.E., Nester E.W., Phillips G.B., Wood W.A. Manual of methods for general bacteriology. – Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1981.
- 15 Садчиков А.П. Методы изучения пресноводного фитопланктона. – М.: Университет и школа, 2003. – 157 с.
- 16 Киселев И.А. Планктон морей и континентальных водоемов. – Л.: Наука, 1969. – 657 с.
- 17 Абакумов В.А. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем. – СПб.: Гидрометеиздат, 1992. – 318с.
- 18 Макарова И.В., Пичкилы Л.О. К некоторым вопросам методики вычисления биомассы фитопланктона // Ботан. журн. – 1970. – Т. 55. – № 10. – С. 1488–1494.
- 19 Белых О.И., Бессудова А.Ю., Гладких А.С., Кузьмина А.Е., Помазкина Г.В., Поповская К.И., Сорокикова Е.Г., Тихонова И.В., Усольцева М.В. Руководство по определению биомассы видов планктона пелагиали оз. Байкал. Методическое пособие. –Иркутск: Изд-во ИГУ, 2011. – 51с.
- 20 Widdel F., Back F. The genus *Desulfotomaculum* // Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). The Prokaryotes. Ecophysiology and Biogeochemistry. – Springer, New York, 1992. – P. 787–794.
- 21 Sambrook J., First E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 350 p.
- 22 Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулохонов И.И., Зайчиков Е.Ф. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – № 4. – С. 547–556.

23 Brosius J., Ullrich A., Paker M.A., Gray A., Dull T.J., Gutell R.R., Noller H.F. Construction and fine mapping for recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli* // *Plasmid*. – 1981. – Vol. 6. – P.112–118.

24 Coorevits A., Dinsdale A.E., Halket G., Lebbe L., De Vos P., Van Landschoot A., Logan N.A. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – Vol. 62. – P. 1470–1485.

25 Brumm P., Land M.L., Hauser L.J., Jeffries C.D., Chang Y.-J., and Mead D.A. Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. Y412MC52, a xylan-degrading strain isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park // *Stand. Genomic Sci.* – 2015. – Vol. 10. – P. 81.

26 Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. – 2010. – V. 26. – № 19. – P. 2460–2461.

27 Edgar R.C. SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv*. 2016.

28 Yi Z., Berney C., Hartikainen H., Mahamdallie S., Gardner M., Boenigk J., Cavalier-Smith T., Bass D. High-throughput sequencing of microbial eukaryotes in Lake Baikal reveals ecologically differentiated communities and novel evolutionary radiations // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2017. – Vol.93. – № 8. – P. fix073.

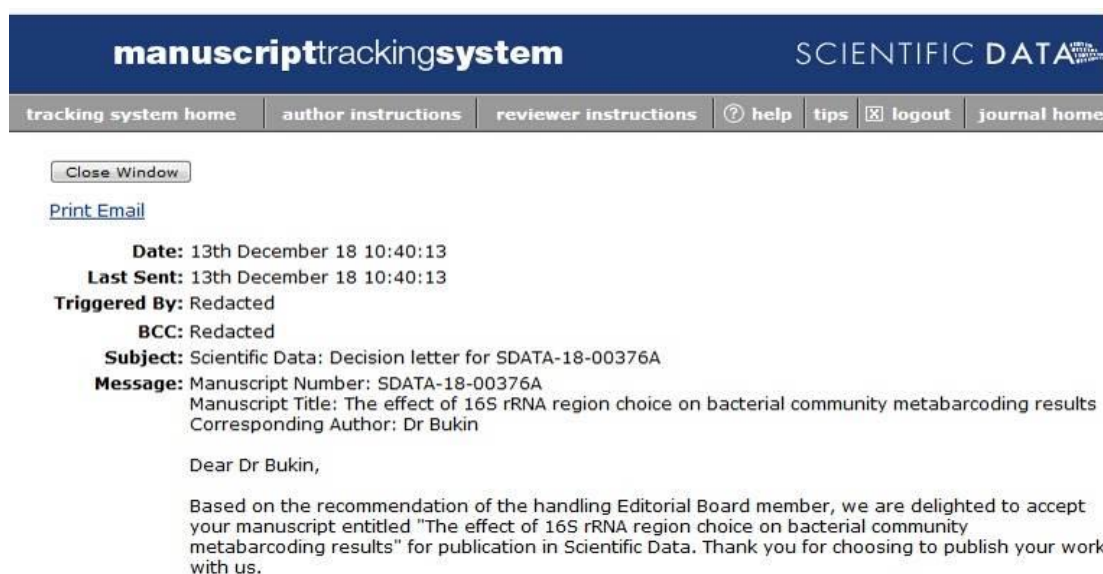
29 Фирсова А.Д., Кузьмина А.Е., Томберг И.В., Потемкина Т. Г., Лихошвай Е.В. Сезонная динамика формирования стоматоцист хризифитовых водорослей в планктоне Южного Байкала // *Известия РАН. Серия биологическая*. – 2008. – № 5. – С. 589–596.

30 Bessudova A., Firsova A.D., Likhoshway Y.V. Silica-scaled chrysophytes of Lake Baikal // *Acta Biologica Sibirica*. – 2017. – Vol. 3. – № 3. – P. 47-56.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ПРОЕКТА ЗА 2018 ГОД

1. Cherkashin E., Kopaygorodsky A., Kazi L., Shigarov A., Paramonov V. Model driven architecture implementation using linked data // Procs. of 24th International Conference, ICIST 2018, Vilnius, Lithuania, October 4-6, 2018. P. 412-423. **WoS, SCOPUS**. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99972-2_34
2. Букин Б.С., Михайлов И.С., Черкашин Е.А., Алгоритм построения сетей взаимодействия видов в сообществах на основе результатов мониторинговых экологических исследований [Текст] // Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». Под ред. В.Д. Лахно. Том 7. Пущино: ИМПБ РАН, 2018. Статья No е93. doi: 10.17537/icmbb18.24. **РИНЦ**
3. Bukin Yu.S, Galachyants Yu.P., Morozov I.V., Bukin S.V., Zakharenko A.S., Zemskaya T.I. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results // Scientific Data – accepted, **WoS , SCOPUS**. *Принята к опубликованию, возможен выход в 2018.*



4. Ivan S. Mikhailov, Yuri S. Bukin, Yulia R. Zakharova, Marina V. Usoltseva, Yuri P. Galachyants, Maria V. Sakirko, Vadim V. Blinov, Yelena V. Likhoshway. Co-occurrence patterns between bacterioplankton and phytoplankton across pelagic zone of Lake Baikal in spring // J. Microbiol. (Korea) - accepted, publication in April 2019. **WoS, SCOPUS**.

← → ↻ https://www.editorialmanager.com/tjom/default.aspx

Journal of Microbiology

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager Role: Author Username: IvanMikhailov

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Ivan Mikhailov, Ph.D.

Page: 1 of 1 (2 total completed submissions) Display 25 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
View Submission View Decision Letter View Attachments	TJOM-D-18-00495	Co-occurrence patterns between bacterioplankton and phytoplankton across pelagic zone of Lake Baikal in spring	12-09-2018	17-09-2018	Completed	17-09-2018	Reject
View Submission Author Response View Decision Letter	TJOM-D-18-00531	Co-occurrence patterns between phytoplankton and bacterioplankton across the pelagic zone of Lake Baikal during spring	22-09-2018	25-11-2018	Completed	25-11-2018	Accept

Page: 1 of 1 (2 total completed submissions) Display 25 results per page.

5. Cherkashin E., Shigarov A., Malkov F., and Morozov A. An Instrumental Environment for Metagenomic Analysis. Proc. Int. Conf. on Information Technologies in the Research of Biodiversity. 2018. *(Принято в печать в издании, индексируемом Web of Science Core Collection, выходит в 2019).*

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
ИНФОРМАЦИЯ О КОЛИЧЕСТВЕ СТАТЕЙ В ВИДЕ ТАБЛИЦЫ

Индикатор	Ед. измерения	2018
Количество публикаций в ведущих российских и международных журналах по результатам исследований, полученных в процессе реализации проекта	единиц	2 (3)
Количество публикаций в мировых научных журналах, индексируемых в базе данных «Сеть науки» (WEB of Science) и/или Scopus	единиц	1 (2)
РИНЦ (исключая WEB of Science и Scopus)	единиц	2 (3)

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОЕКТА

Этапы 2018 г.:

1. Проектирование и прототипирование средств управления данными и рабочими процессами веб-ориентированной информационно-аналитической инфраструктуры для поддержки исследования микробиома оз. Байкал и курирования больших объемов данных высокопроизводительного секвенирования.
2. Отбор проб из разных экотопов по всему Байкалу, выделение ДНК, секвенирование библиотек, таксономический анализ сообществ.
3. Разработка алгоритма, позволяющего на основе результатов корреляционного анализа построить сеть взаимодействий организмов в изучаемом сообществе.
4. Реконструкция полных геномов выделенных в культуры перспективных для практического применения штаммов бактерий.