

# Метагеномний аналіз для мікробної екології і біотехнології

Л. П. Овчаренко, Н. О. Козировська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

Leonst@ukr.net

---

*Метагеноміка вивчає сукупність геномів мікроорганізмів довкілля методами молекулярної генетики та інших галузей біологічної науки (біоінформатика, протеоміка, метаболоміка). Метагеномний аналіз дає можливість реконструювати мікробні угруповання, у тому числі некультивованих мікроорганізмів, практично будь-яких екосистем, визначити їхні функції, взаємини з макроорганізмами тощо. У найближчі роки ключовим у метагеноміці буде пошук нових генів для біотехнологічної та фармацевтичної промисловості.*

*Ключові слова: метагеноміка, мікробна екологія, спільноти мікроорганізмів.*

---

**Вступ.** Метагеноміка – це генетичний аналіз спільнот мікроорганізмів, який базується на нових значних досягненнях у розробці методів виділення і очищення нуклеїнових кислот, удосконаленні систем клонування за рахунок створення нових містких векторів, сучасних підходів до секвенування ДНК, що дозволяють визначити мільйони пар нуклеотидів (п. н.) за лічені години [1]. Потужним обґрунтуванням розвитку метагеномного аналізу стало встановлення того факту, що більш ніж 99 % видів прокаріотів не можна культивувати навіть на найспецифічніших штучних середовищах, адже тривалий час саме отримання мікроорганізму в чистій культурі вважалося основною метою мікробіологічного дослідження [2].

Справжній переворот у мікробній екології здійснили дослідження різноманітності генів рибосомних РНК бактерій у пробах із навколишнього середовища. Послідовності цих генів виявляли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

і секвенували за Сенгером [3]. Таким способом отримано велику кількість послідовностей, які не належали жодному з культивованих видів, і тим самим засвідчено, що в природі існує велике різноманіття прокаріотних видів, раніше недоступних науковцям [4]. Варіації зазначеного методу спричинили в подальшому появу і розвиток цілого комплексу незалежних від культивування методик для таких важливих цілей, як реконструкція філогенії мікроорганізмів, порівняння мікроорганізмів з різних зразків на основі порівняння їхніх нуклеотидних послідовностей, тобто ці дослідження заклали початок молекулярній філогенії.

Філогенетичний аналіз біорізноманіття угруповань мікроорганізмів довкілля вважають ранньою формою метагеноміки [5]. За допомогою філогенетичних аналізів мікробних спільнот різноманітних екосистем, проведених методами фінгерпринтування без клонування ДНК/кДНК, показано, що їхня структура є доволі складною і мікроскопічних організмів значно більше, ніж тих, що ми спроможні культивувати у лабораторії і ра-

хувати методами серійних розведень, мікроскопії тощо [2].

Другий етап метагеномних досліджень – це конструювання бібліотек генів, виділених із довкілля, та пошук у них певних генів, які кодують ключові ферменти кругообігу речовин у природі, або генів, потрібних для біотехнологічних цілей. Тобто на цьому етапі аналізували лише певну частину клонованого матеріалу, інша залишалася для майбутніх досліджень.

На третьому етапі розвитку метагеноміки розпочалося секвенування метагеномних бібліотек, яке значно розширило можливості досліджень, надаючи інформацію про різноманітність функцій мікроорганізмів та зв'язок між ними, геномну організацію некультивованих організмів, горизонтальне перенесення генів у довкіллі між організмами. Сучасний етап метагеноміки – секвенування дискретних фрагментів ДНК мікроорганізмів довкілля без клонування та складання їх у повні послідовності генів/геномів окремих членів спільнот. Новітні підходи теоретично дозволяють реконструювати геноми присутніх у певній екосистемі ендемних мікроорганізмів та визначити їхні функції. Проте, як і на попередніх етапах розвитку метагеномних досліджень, існують тимчасові обмеження. Метою цієї публікації є огляд етапів розвитку метагеномних досліджень та їхніх успіхів у вивченні мікробної екології і використанні в біотехнології.

**Філогенетичний аналіз.** Технології рекомбінантної ДНК і секвенування ДНК, біоінформатичні програми, створені наприкінці 60-х–початку 70-х рр. минулого століття, дали початок дослідженню біорозмаїття у природі та встановленню філогенетичних зв'язків між організмами на молекулярному рівні. Теоретичну базу для визначення місця певних мікроорганізмів у загальній класифікації молекулярними методами підвели Полінг та Зукеркандл [6], які стверджували, що біологічні макромолекули еволюціонують разом з організмами, отже, можуть бути використані для встановлення еволюційних родинних зв'язків між ними. Ця ідея стала поштовхом для виникнення нової галузі такої науки, як молекулярна філогенетика, – таксономії, що ґрунтується на аналізі по-

слідовностей ДНК генів спільного походження у ряду організмів. На практиці для цілей таксономії прокариотів використовують життєво важливі гени «домашнього господарства» (housekeeping) через їхню поширеність у всіх прокариотів, а також завдяки відносній консервативності послідовностей (в силу значущості функції). Ці гени мають консервативні ділянки, які еволюційно збереглися у мікроорганізмів і дозволяють встановити їхнє походження і філогенетичні зв'язки з іншими бактеріями, та варіюючі, що дають можливість ідентифікувати мікроорганізми на рівні виду і штаму. Незважаючи на безумовну визнаність філогенетичного методу, в основі якого лежить аналіз рДНК, він має суттєвий недолік, який стає явним за масштабних аналізів. По-перше, деякі мікроорганізми мають кілька оперонів *rrn*-генів, що ускладнює точний аналіз таксономічної приналежності організму. По-друге, складнощі в ідентифікації мікроорганізмів до роду і виду виникають при визначенні нової таксономічної одиниці через недостатню кількість відповідних послідовностей у банках генів, при внутрішньовидовій спорідненості послідовностей рДНК (геномовари, ековари, геовари) (детальніше можна ознайомитися в [7]). Нові підходи до визначення виду, такі як мультилокусний аналіз послідовностей ДНК, мікроарейний аналіз, секвенування геному, надають можливість точніше визначати таксономічну приналежність мікроорганізмів.

Розробка ПЛР і використання її для екологічних досліджень (вперше це зробили Стефан та Атлас [8]) суттєво прискорили темпи дослідження мікробних угруповань в усіх можливих екосистемах і започаткували, окрім усього іншого, еру «інвентаризації» мікробного царства як історичного (викопного), так і сучасного. Цей процес триває й до сьогодні, але завдання ускладнилося через необхідність перейти від геноміки індивідуального організму до геноміки спільнот окремих екосистем, тобто до метагеноміки.

**Методи генетичного профілювання мікроорганізмів.** Застосування геномних методів без необхідності культивування надає можливість повнішого аналізу спільнот мікроорганізмів, але не відображає реальної картини, яка існує у природ-

них зразках. Найпростішими і найвикористовуванишими методами аналізу різноманіття мікроорганізмів і структури їхньої спільноти є аналіз рибосомного міжгенного спейсера і рестрикційний аналіз ампліфікованої рДНК [9–11]. Вони не потребують спеціального обладнання або дорогих витратних матеріалів і швидко дають інформацію про різноманіття мікроорганізмів у досліджуваному зразку або про динаміку змін структури спільноти у певному ценозі. Градієнтний гель-електрофорез у денатурувальному гелі [12] та денатурувальна високоефективна рідинна хроматографія [13] дають змогу здійснювати розділення послідовностей ДНК однакового розміру, але з різною первинною будовою і відповідно різною рухливістю в гелі чи розчині за умов денатурації. Розробка стратегії цих методів стала суттєвим кроком уперед, оскільки дозволила виокремлювати розділені ПЛР-фрагменти ДНК з гелю і аналізувати їхні послідовності прямим секвенуванням для ідентифікації мікроорганізмів без створення бібліотек генів. Метод поліморфізму довжин мічених рестрикційних фрагментів ДНК – наступний крок у прогресуючому дослідженні мікробних спільнот. Цей метод базується на доступних базах даних для швидкої розшифровки складу досліджуваних спільнот [14]. Усі методи засновані на ПЛР і різняться між собою за здатністю визначати максимальне біорізноманіття мікроорганізмів у спільноті, а також за простотою отримання результатів, обладнанням, витратами на проведення аналізів тощо.

Метагеномні технології поєднують стратегії виділення і очищення нуклеїнових кислот, конструювання бібліотек генів, технології скринінгу потрібних генів, секвенування, біоінформатичний аналіз визначених послідовностей ДНК. Наразі зупинимося на успіхах у розвитку тих технологічних підходів, які зумовили розвиток метагеномних досліджень.

Для конструювання бібліотек ДНК докілька вектори обирають залежно від мети дослідження. Основний параметр вектора – його розмір і відповідно довжина послідовності, яку можна в нього клонувати. Невеликі висококопійні вектори на основі плазмід, здатних нести вставки розміром 2–6 тис. п. н., застосовують при так званих секвену-

ваннях за типом «пострілу з дробовика», або «shotgun». При функціональному скринінгу генів, які кодують важливі біоорганічні молекули, потрібно створювати бібліотеки послідовностей значних розмірів для повного клонування необхідних генів. Тому в цьому випадку застосовують великі низькокопійні вектори: фазміди (вставки до 40 тис. п. н.), бактеріальні штучні хромосоми (вставки 100–300 тис. п. н., зрідка – до 600 тис. п. н.), косміди, фагові вектори і штучні хромосоми дріжджів. Цільовим підходом найчастіше користуються у філогенетичних дослідженнях, клонуючи філогенетичні маркери, найчастіше серед яких 16S рДНК. Проте можуть створюватися і бібліотеки зі вставками великих чи середніх розмірів. Такий метод в основному використовують для встановлення послідовності певного гена.

Секвенування є базовим інструментом метагеноміки для вивчення різноманіття мікробного світу і його функцій без необхідності культивування живих організмів. Секвенування за Сенгером, або секвенування із зупинкою синтезу, широко застосовують у метагеномних дослідженнях. Секвенують послідовності, отримані за допомогою ПЛР, або клоновані фрагменти з метагеномних бібліотек. Альтернативною стратегією аналізу мікробних спільнот без клонування ДНК, що потребує тривалого аналізу бібліотеки генів, де часом спостерігається нестабільність або токсичність послідовностей при зберіганні в *Escherichia coli*, є метод піросеквенування. Цей метод має деякі переваги над традиційними. Підготовка проби для піросеквенування включає лише виділення ДНК без необхідності клонування її у вектори. При цьому малі фрагменти ДНК не втрачаються, як це буває при конструюванні бібліотек, результати отримують дуже швидко, наприклад, секвенування усіх транскриптів тканин арабідопсису займає один тиждень [15], а визначення повних геномів бактерій здійснюється за 4 год з точністю 99,96 % [16]. Вартість секвенування становить на сьогодні менше \$0,03 для EST (таксономічна послідовність, що експресується). Для отримання точних даних необхідно використовувати короткі фрагменти ДНК, наразі Roche 454 Genome Sequencer 20 System надійно визначає послідовності до 250 п. н., багато-

разове перекривання послідовностей та потужне програмне забезпечення [17].

Ще одним перспективним методом секвенування ДНК є полоні-секвенування. Полоні означає «полімеразна колонія» (polymerase colony). В основі цього підходу також лежить секвенування методом синтезу або в реальному часі [18].

На стадії розробки перебуває метод секвенування, який базується на проходженні нитки ДНК через нанопору в мембрані. Дані можна отримати, реєструючи зміни потенціалу мембрани, специфічні перепади якого пов'язані з типом нуклеотиду, що проходить через мембрану [19]. Можливі також модифікації методу з використанням флуоресценції. Прогнозують, що в разі впровадження цього методу геном людини можливо буде секвенувати за 20 год [20].

Дві основні технології аналізу рекомбінантів після клонування ДНК ґрунтуються на визначенні або клонованій послідовності ДНК, або функції клону. Секвенування метагеномних бібліотек, створених з ДНК мікроорганізмів певних екосистем, – це сучасний рівень аналізу різноманіття мікроорганізмів у довкіллі, у тому числі й тих, що не культивуються. Проте він має певне обмеження через те, що нові послідовності не можуть бути впізнані через відсутність збігу з уже відомими. Функціональний скринінг, важливий у біотехнологічних дослідженнях для пошуку генів з новими активностями, перспективними для практичного використання, дає можливість визначати досі невідомі послідовності генів, збагачуючи банки генів. Однак цей підхід також обмежений можливістю метагеномних генів експресуватися в гетерологічному хазяїні. Окрім того, для клонування цілого оперону, що є необхідним при функціональних дослідженнях, потрібно клонувати великі фрагменти ДНК (більше 100 тис. п. н.). Тому спеціально розробили метод виділення високомолекулярної ДНК з ґрунту, який поділяється на прямий і непрямий [21, 22]. Особливістю першого варіанту є лізис бактерій *in situ* в ґрунті до виділення і очищення ДНК. Новаторським і практичним є застосування м'якого лізису і очищення ДНК у гелях під час звичайного або пульс-електрофорезу [21]. Основною метою непрямого методу є захист

ДНК від впливу зовнішніх фізичних факторів, через які відбувається вкорочення її фрагментів. Для цього клітини бактерій спочатку виділяють з ґрунту. Проте у порівнянні з прямим способом у 10–100 разів зменшується вихід ДНК. Непрямий метод використано для отримання ДНК з океанічного бактеріопланктону [23]. Для запобігання втрат під час виділення ДНК із природних зразків або для збереження нечисельних популяцій мікроорганізмів застосовують стадію пре-культивуації або навіть декілька таких стадій [22].

Існують два загальноприйнятних підходи до аналізу послідовностей ДНК для їхньої ідентифікації: перший використовує програму BLASTN (NCBI – Національний Інститут Біотехнологічної Інформації, США) для порівняння їх з відомими послідовностями, депонованими у доступних базах даних; другий підхід полягає в ідентифікації у невідомій послідовності ДНК відомих генів (*rrs*, *rrl*, *gyr*, *rpo* та ін). Однією з програм автоматизованого аналізу секвенованих фрагментів ДНК є програма MEGAN [24] ([www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/megan](http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/megan)), в основу якої покладено BLASTN. Проте якщо короткі послідовності, отримані «shotgun»-секвенуванням, не мають гена – філогенетичного маркера, то визначити їхню приналежність неможливо.

Один з нових підходів ідентифікації невідомих послідовностей використовує той факт, що завдяки коротким олігонуклеотидам, широко представленим у геномі, послідовність має свій «портрет» або, скоріше, почерк [25–29]. Зокрема, Рева [25] впровадив концепцію використання профілю олігонуклеотидів (oligonucleotide usage, OU) і дистанцій (D) між двома OU для визначення таксономічної приналежності бактерій у пробах ДНК. Показано, що D не залежить від довжини послідовності ДНК, отже, OU-профілі невідомих послідовностей можна порівнювати із стандартними, вирахованими для відомих геномів бактерій. За допомогою тетра-нуклеотидних «слів» ідентифікуються окремі фрагменти ДНК однієї бактерії, вилучені із складної суміші ДНК природного зразка, і складаються у штучну послідовність, яку визначають при порівнянні з відомими послідовностями. Для ідентифікації невідомих послідовностей необхідно ма-

ти базу певної кількості стандартних тетрануклеотидних патернів відомих повних послідовностей геномів бактерій, які згруповано в ієрархічну систему за допомогою алгоритму групування (hierarchical grouping algorithm), і порівнювати патерни невідомої послідовності зі стандартними патернами вибірки. Така системи ідентифікації бактерій не залежить від розміру бази даних.

#### Функціональний аналіз мікробних спільнот.

Для виявлення окремих активностей мікроорганізмів (наприклад, ліпазної активності бактерій) у природному зразку необхідно проаналізувати тисячі клонів, тому розробляють продуктивніші методи, ніж рутинне перебирання клонів. Нові підходи дають можливість визначати утворення певних метаболітів безпосередньо у клітинах живих організмів.

Групою Гандельсмана [30] розроблено систему внутрішньоклітинного виявлення малих молекул за допомогою біосенсора для роботи з метагеномними бібліотеками. Таку систему під назвою METREX (metabolite regulated expression), або внутрішньоклітинного екрану – уловлювача (intracellular screen) потрібних біомолекул, створено за принципом детекції індукторів кворум-залежної *luxI-luxR* системи за допомогою «молекулярної лампи» – білка GFP. Сенсор локалізовано в *E. coli*, хазяїні метагеномних клонів, серед яких активні можна визначати за флуоресценцією клітин. METREX дозволяє ідентифікувати широке коло біологічно активних молекул, які індукують кворум-сенсинг (індоксил, ацильовані гомосеринлактони, антибіотики) або інгібують цей процес. З використанням системи функціональної діагностики METREX у ґрунті Аляски знайдено нові гени, які кодують індуктори кворум-залежної *luxI-luxR*-системи, але не мають гомології з уже описаними.

Іншу систему швидкої ідентифікації клонів метагеномних бібліотек, які мають потенціал каталітичної експресії (SIGEX), створено Учियाма зі співавт. [31]. У даному разі субстрат виступає індуктором експресії злиття репортерного гена, що кодує GFP, з опероном гена, який відслідковують у бібліотеці. Позитивні клони ідентифікують за допомогою сортування флуоресцентно активованих клітин.

Технологія мікроареїв ДНК є однією з найпотужніших у визначенні функцій мікроорганізмів, яка дає можливість визначати одночасно активність генів майже всього геному певного організму під впливом біотичних або абіотичних чинників [32]. Завданням мікроарейного аналізу в екофізіології є одночасне визначення активності багатьох, якщо не всіх, мікробних популяцій у природних спільнотах по відношенню до дії чинників довкілля. Це можливо виконати, виявляючи мРНК у зразках, у яких вона, однак, нестабільна і нечисельна. Кількість зондів в ареях для визначення функціональних генів (АФГ) обчислюється десятками сотень, вбирає серед них різноманітні ключові гени циклу азоту, сірки, вуглецю, деградації органічних речовин, стійкості до металів тощо. Зондами можуть бути ПЛР-продукти консервативних ділянок цих генів або короткі олігонуклеотиди, виготовлені на основі інформації про ці гени. Останні мають певну перевагу, оскільки спрямовані на детекцію конкретного гена [33].

мРНК, яку можна визначати мікроарейним аналізом, не дає інформації щодо того, коли відбувалася експресія потрібних генів: у момент відбору зразка чи раніше. Незважаючи на те, що термін інтактності мРНК короткий, відомо, що вона інколи зберігається у деяких зразках (тканини рослин) доволі довго і це може призводити до отримання помилкового позитивного результату. Для одержання правдивої інформації щодо фізіологічних властивостей мікроорганізмів у природному середовищі в реальному часі на рівні однієї клітини розроблено такі технології, як зондування зразка стабільними ізотопами, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) і комбінований метод FISH і мікроавторадіографії (FISH-MAR) [34–38]. Методи визначення функціональної активності бактерій урізноманітнюються за рахунок поєднання технології мікроареїв з використанням радіоактивних або стабільних ізотопів, якими мітять субстрати для бактерій [39]. Ізотопні філогенетичні олігонуклеотидні ареї містять сотні зондів для гібридизації з радіоактивною рРНК, виділеною з природного зразка, у який додано мічену «наживку» для бактерій, і застосовують для масштабного аналізу великих ценозів. Співвідношення інтенсивності флу-

оресценції і рівня радіоактивності у місці гібридизації дає інформацію про те, як активно популяція організмів, яку репрезентує мічена флуоресціююча рРНК, поглинає мітку в її рРНК [39]. Перспектива застосування ізотопних ареїв для аналізу біогеохімічних процесів, які відбуваються за участі мікроорганізмів у складних природних спільнотах, є беззаперечною через те, що радіоактивно мічена рРНК мікроорганізмів у середовищі їхнього існування дає адекватнішу від транскриптоми і протеоми інформацію про активність організму, а також про взаємодію останніх на різних рівнях організації. Висока продуктивність технології і можливість кількісної оцінки фізіологічної активності мікроорганізмів, безумовно, робить її одним із лідерів у дослідженні екофізіології мікроорганізмів.

**Пошук генів для біотехнологічної промисловості.** Аналіз чистих культур ґрунтових мікроорганізмів показує, що вони є надійним джерелом антибіотиків, ліків, антиканцерогенних засобів, імунодепресантів тощо [40, 41]. Окрім того, ґрунт є нішою продуцентів цінних для промисловості ферментів та біоактивних молекул. Пошук нових індивідуальних генів та цілих оперонів, що кодують біосинтетичні шляхи або шляхи деградації складних речовин, ведеться у метагеномних бібліотеках, створених із ДНК, виділеної з різноманітних природних зразків.

Ферментні системи *E. coli* – штаму-господаря більшості бібліотек для функціональної метагеноміки, часто досить сильно відрізняються від материнських для певної одиниці експресії. Через це більшість генів не експресуються, або ж не утворюють повноцінного продукту. Тому робляться спроби використання інших видів, наприклад, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida* для створення функціональних бібліотек [42].

Філогенетичним аналізом генів 16S рРНК та комбінуванням функціонального аналізу бібліотек складних ґрунтових спільнот і питної води, а також їх секвенуванням виявлено гени незвичних естераз, властивість яких витримувати великі значення рН не кореспондується з умовами існування мікроорганізмів – власників генів [43–46]. До переліку

цінних для промисловості біотехпродуктів входять ферменти деполімеризації рослинних полісахаридів. Одним із таких ферментів є амілаза, що розкладає крохмаль, – цінний фермент, який додають у миучі засоби. З метагеному ґрунту виділено декілька генів, що кодують амілази з незвичними активностями, оптимальними або при низьких, або при високих рН [47, 48]. Маніпулювання генами дозволить конструювати штами мікроорганізмів для виробництва ферментів з потрібними властивостями. Целюлоза – найпоширеніший рослинний полімер на планеті, а целюлаза – один із ферментів, який його гідролізує. Пошуки нових генів целюлаз як у звичайних середовищах, так і в екстремальних показали генетичне різноманіття генів, що їх кодують, а також визначили характеристики ферментів, необхідні для промислового виробництва [49, 50]. Хітин є другим за розповсюдженням природним полімером після целюлози, промислово цінну хітиназу знайдено у метагеномі морського водного середовища [51, 52]. Важливим у господарській діяльності є фермент ксиланаза/ксилозидаза, гени якого знаходять у незвичних середовищах, де відбувається розщеплення рослинних рештків: кишечник комах, відстійники молочних ферм тощо. Зокрема, чотири ксиланози, виявлені у метагеномі комах, відрізняються тим, що продукують унікальні продукти гідролізу і філогенетично дистанціюються від інших відомих аналогічних ферментів, що свідчить про їхню незалежну еволюцію [53, 54]. Агарози також потрапили у фокус біотехнологічної промисловості, тому їхні гени є об'єктом пошуку в метагеномах різних середовищ. Фермент агарози розкладає полімер агар, компонент морських водоростей, тому раніше вважали, що він зустрічається лише у морських середовищах. Проте метагеномний аналіз ґрунтових спільнот мікроорганізмів показав наявність у них цього ферменту [47]. Загалом варто зазначити, що ґрунтові метагеноми є найперспективнішими джерелами нових генів. В одному метагеномному проєкті ідентифіковано низку перспективних для промисловості агарозних генів, а також виявлено гени, які кодують ферменти амідазу (*amiA*), дві целюлази (*gnuB* і *uvs080*), амілазу (*amyA*), дві пектатліази (*pelA* та *uvs119*), кластер двох ліпазних генів [47].

Однак не менш перспективними джерелами генів, що кодують ферменти деполімеризації полісахаридів, є мікробіота кишечника тварин і людини. Ферменти деградації рослинної сировини (геміцелюлози, ксиллази, ксиланази, арабінофуранозідази, глюкуронідази та ін., а також лігнінпероксидази, лакази тощо) бактерій зазначеної екосистеми можна застосовувати в промисловості [55, 56].

Фітаза – фермент, відповідальний за мінералізацію фосфору, його використовують у сільському господарстві для корму птахів, які споживають мінеральні гранули і не мають ферментів, щоб їх перетравити. У природі фітази відіграють ключову роль у кругообігу фосфору. Біоінформатичні дослідження повних геномів мікроорганізмів і метагеномів доквілля у NCBI та інших базах даних дозволили визначити розповсюдження чотирьох класів фітаз у мікробному світі; -фітази зустрічаються у водних організмів, а також у ґрунтових мікробів та асоційованих з рослинами бактерій. Гени, що кодують фітази, існують або як незалежні одиниці, або тісно асоційовані в оперонах з TopB-залежними рецептор-подібними генами і, можливо, відіграють певну роль у циклі перетворення фосфору і заліза у ґрунтових і водних угрупованнях мікроорганізмів [57].

Метагеноміку використовують для виявлення нових генів біосинтезу біотину та вітаміну С [58, 59]. Декілька метагеномних бібліотек проскановано у пошуках генів біосинтезу біотину, які знайдено в космідному банку генів, створеному з метагеному лісового ґрунту [58]. Гени, відповідальні за синтез попередників вітамінів групи В, виявлено у мікробіомі кишечника здорової людини [57].

Деякі хімічні процеси потребують багатовитратної енергії та шкідливих умов праці, наприклад, хімічний гідроліз нітрילів. Такі процеси у виробництві хімічних речовин успішно замінюють використанням біотехнологічних продуктів – біокатализаторів. Нітрилогідратазу застосовують для виробництва акриламиду та синтезу вітаміну нікотинамиду. Нітрилази є рідкісними у геномах мікроорганізмів, тому «полювання» за їхніми генами є рутинною роботою. Два повідомлення про скринінг нітрилаз у геномах мікроорганізмів із

довкілля свідчать про виділення генів 337 нових ферментів нітрилаз [60, 61]. Гліцеролгідратаза каталізує перетворення глюкози у 1,3-пропандіол, ключову речовину у синтезі поліестерного волокна, поліуретану та циклічних органічних речовин. Метагеномний аналіз природних мікробних спільнот на присутність такого важливого для промисловості ферменту завершився виділенням клону, якому притаманна каталітична активність і стабільність продукту [62].

Оксидоредуктази відіграють суттєву роль у промисловому виробництві широкого кола біотехпродуктів: ефірів, органічних кислот, амінокислот, спиртів. Лакази (ЕС 1.10.3.2) окиснюють багато сполук фенольної і нефенольної природи, у тому числі фарби, поліциклічні ароматичні вуглеводні, пестициди, а також беруть участь у реакціях полі- і деполімеризації, метилювання–деметилювання, тому вони є особливо цінними для промисловості і охорони довкілля [63]. У метагеномних банках ДНК, сконструйованих із використанням збагачення послідовностей, знаходять необхідні біокатализатори [60]. Так, протеази – ферменти гідролізу білків – є незамінними у виробництві детергентів та харчовій промисловості, тому пошук їхніх нових активних форм є нагальною проблемою біотехнологічної промисловості. [64]. У метагеномному дослідженні доквілля знайдено 4-гідроксибутират-дегідрогенази, які беруть участь у метаболізмі полі-3-гідроксибутирату – речовини, яку прогнозують застосовувати замість викопного пального [65].

Найшвидшими темпами ведеться пошук нових ліків, особливо антибіотиків, які пробують знайти повсюдно, в основному, у ґрунтових спільнотах. Розмаїття генів нових антибіотиків виявляють при ретельному дослідженні метагеномних бібліотек [66]. У ґрунтах Аляски є мікроорганізми, які в своїх геномах мають гени -лактамних антибіотиків, проте рівень гомології з відкритими раніше складає усього 40–60 %. Деякі з нових генів антибіотиків не експресуються в *E. coli*, тому бібліотеки підтримують у стрептоміцетах.

Варто зазначити, що пошук нових генів у доквіллі традиційними інструментами геноміки і метагеноміки інколи не призводить до успіху через

низьку гомологію генів. Так, намагання знайти нові дегідрогенази завдяки ампліфікації гомологічних послідовностей у ДНК, виділеної з природного середовища, не досягли мети [65]. Щоб ідентифікувати необхідні ферменти в навколишньому природному середовищі застосовують протеомний аналіз, який базується на попередньому досвіді вивчення метаболічних шляхів мікроорганізмів.

**Метагеномні проекти на основі «shotgun»-секвенування мікробних спільнот.** Проекти прямого «shotgun»-секвенування ДНК спільнот мікроорганізмів певних екосистем стали реальністю після введення у практику методів швидкого визначення послідовностей ДНК. Перші проекти секвенування метагеномів доквілля логічно було починати із просто організованих екосистем. Такими є системи, що мають низький рівень доступних органічних речовин, якими, ймовірно, живиться, більшість мікроорганізмів, або екстремальні умови існування, які обмежують різноманіття мікробів і надають перевагу тільки пристосованим видам.

Метагеном бактерій і археїв Саргасового моря (Атлантичний океан, неподалік Бермудів) з бідним вмістом поживних речовин обрано для секвенування у першому масштабному проекті Вентера з колегами (2004) [67]. Увагу було сфокусовано на мікроорганізмах, відібраних з води за допомогою фільтрів з розмірами пор від 0,8 до 0,1 мкм. Виділену ДНК подрібнювали рестриктазами на фрагменти певного розміру, які далі секвенували (6,3 млрд п. н.) і визначені послідовності збирали, поєднуючи кінці за допомогою потужної комп'ютерної програми. Проте половину із 7,7 млн визначених послідовностей фрагментів ДНК реконструювати поки що не вдалося, вірогідно, з технічних причин. Два методи аналізу використано для ідентифікації розмаїття мікроорганізмів Саргасового моря: молекулярна філогенія на основі 16S рРНК [67, 68] та множинні білкові маркерні гени у поєднанні з методом 16S рРНК [69] для точнішого аналізу, а також кількісного визначення складу мікробних спільнот океану. Завдяки цим підходам знайдено 1,2 млн відкритих рамок зчитування (ВРЗ), 1633 риботиби з 1800 філотипів, додаткові з яких виявлено комбінованим методом. 148 видів мікроор-

ганізмів ідентифіковано як нові. 782 ВРЗ мали високий рівень гомології з генами, які кодують протородопсини – фоторецептори для вироблення енергії мікробними аборигенами океану. Встановлено вищий, ніж очікувалося, рівень розмаїття послідовностей вірусного походження, що свідчить про широке розповсюдження вірусів в океанічних водах.

**Дослідження морських ДНК-вмісних вірусів.** У 2006 році проведено широкомасштабне метагеномне дослідження, головною метою якого було вивчення океанічних вірусів [70]. Проби відбирали в чотирьох місцях: у Саргасовому морі, Мексиканській затоці, біля узбережжя Британської Колумбії та північної Канади і Аляски. Всього на різних глибинах взято 183 проби. Вірусні частки відфільтрували і виділили з них ДНК. Загалом відсеквеновано 1768297 фрагментів, а середня довжина їх становить 100 п. н. Під час аналізу отримано велику кількість корисних даних. Найважливішим відкриттям стало те, що 91 % послідовностей належать невідомим раніше видам, а більшість серед видів складають ДНК-вмісні фаги ціанобактерій. До цього дослідження не було відомо про існування морських вірусів, що містять однопіланцюгову ДНК. У результаті даного дослідження знайдено такі віруси, і вони належать до родини *Microviridae*. Всього ж по завершенні дослідження вченими передбачено існування не менше кількох сотень тисяч видів вірусів у Світовому океані.

**Реконструкція мікробної спільноти із закиснених шахтних дренажних вод.** Іншою спробою реконструювати природну мікробну спільноту простої екосистеми став проект секвенування метагеномної бібліотеки прокариотів-екстремофілів, які утворюють біоплівку у закиснених дренажних водах залізородних шахт. У процесі окиснення заліза виділяється енергія, достатня для життєдіяльності таких хемолітотрофів, як *Leptospirillum ferrooxidans* та *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Найпоширенішою сполукою заліза є пірит ( $\text{FeS}_2$ ), окиснення якого спричиняє вивільнення сульфату ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) та утворення сірчаної кислоти, яка знижує величину рН.

Метагеномним аналізом біоплівки з копальні у Залізній горі (Каліфорнія, США) визначено струк-



туру спільноти з трьох бактерійних та трьох архейних видів, що дозволило змодельовати метаболічні процеси, які відбуваються у мікроекосистемі внутрішніх шахтних вод [71]. Майже повністю було реконструйовано повний геном *Leptospirillum* групи II та *Ferroplasma* типу II. В однієї з бактерій, *Leptospirillum* групи III, знайдено невідомі гени азотфіксації з незвичною нітрогеназою. Протеомний аналіз білків, виділених з цієї спільноти, виявив новий білок, причетний до окиснення заліза. Поєднання протеомного аналізу з метагеномним допомогло ідентифікувати цей білок у *Leptospirillum* групи II та встановити його належність до с-типу цитохрому [72].

**Метагеномний аналіз ґрунтових мікробних спільнот.** Ґрунтові спільноти є дуже складними, виходячи зі структури ґрунту та його фізико-хімічних властивостей. Їхня життєва спроможність залежить від присутності макроорганізмів у системі та від абіотичних чинників, таких як вода, кисень, рН, температура тощо, які коливаються упродовж доби та сезонів. Усі ці фактори разом створюють належні умови для розвитку розмаїття мікроскопічних організмів. За оцінками дослідників, 1 г нативного ґрунту містить понад мільярд мікроскопічних клітин, представлених 1 млн різних генотипів [73, 74]. У порівнянні з цими даними загальна кількість відомих культивованих мікроорганізмів становить 0,1–1,0 % існуючих мікроорганізмів.

Нині сконструйовано метагеномні бібліотеки з різноманітних ґрунтів лук, пасовищ, лісів, агроценозів [74–76]. Проблеми їхнього аналізу пов'язані із складною структурою спільнот. Наприклад, бібліотека мікробних геномів ґрунту з ферми штату Міннесота містить приблизно 5 тис. видів і 104–105 штамів, проте 150 тис. окремо прочитаних фрагментів послідовностей ДНК неможливо поки що скласти у значущі послідовності [77]. Аналіз бібліотеки *in silico* показав, що з відомих генів переважають ВРЗ, які кодують целобіозофосфорилазу, що розкладає рослинні залишки у ґрунті. Загалом у спільноті домінують неідентифіковані ВРЗ.

**Метагеномний аналіз мікробних спільнот кишечника людини.** Мікрофлора виконує багато корисних функцій в організмі, пов'язаних з трав-

ленням і захистом від патогенів, однак, з іншого боку, деякі хвороби, такі як рак шлунку, лімфома лімфоїдної тканини, некротичний ентероколіт, також пов'язують з мікробіотою травного тракту [78, 79]. Більшість представників мікробіоти людини є некультивованими [80]. На сьогодні невідомі способи культивування збудників таких захворювань, як сифіліс, пародонтоз, гінгівіт та ін. [81, 82]. Генетичні методи дають більші можливості для дослідження мікроорганізмів здорової або хворої людини. Для цього в Національному Інституті здоров'я (США) розпочато проект секвенування мікробіоти людини (бактерій, вірусів, мікроскопічних еукаріотів), що співіснують з організмом людини.

Перший метагеномний проект прямого секвенування мікробіоти людини стосувався мікробіоми кишечника. «Shotgun»-секвенуванням мікробіоми дистальної частини кишечника здорових людей – чоловіка і жінки, які не вживали ліків протягом року, виявлено більше 50 тис. ВРЗ (загалом 60 % усього секвенованого матеріалу) [56]. Аналіз утворених методом «shotgun» послідовностей, а також клонованих ПЛР послідовностей 16S рДНК дозволив ідентифікувати 72 бактеріальних філотипи, які належать до двох відділів: *Firmicutes* (62 філотипи) та *Actinobacteria* (10). Серед ідентифікованих філотипів визначено 16 нових невідомих філотипів бактерій. Загалом, за оцінками авторів, у подібних зразках людини можна очікувати до 300 бактеріальних філотипів. Секвенований матеріал проаналізовано біоінформатичними програмами з використанням KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, version 37) та COGs (Clusters of Orthologous Groups) для прогнозування можливих фізіологічних функцій секвенованої мікробіоти [83, 84]. Перші результати аналізу показали, що людська мікробіома має великі можливості для метаболізму гліканів, амінокислот і ксенобіотиків (деградація ди- та тетрахлоретану, капролактаму, бензоату), а також завдяки мікробам має здатність до метаногенезу і біосинтезу вітамінів, незамінних амінокислот та ізопреноїдів.

**Метагеномний аналіз коралових асоціатів.** Коралові голобіонти *Porites astreoides* асоційовані з динамічною спільнотою ендолітичних водорос-

тей, а також грибів, бактерій, археїв і вірусів. Відомо, що корали чітко реагують на зміни у навколишньому середовищі, вірогідно, за рахунок мікробних асоціатів, тому їхнє всебічне вивчення є наразі актуальним завданням мікробної екології. Результати аналізу секвенованих послідовностей і функціонального аналізу спільноти мікроорганізмів, асоційованих з голобіонтами, показали, що ендолітичні гриби представлено трьома з чотирьох відомих філій, а бактерії утворюють спільноту з представників *Proteobacteria* (68 %), *Firmicutes* (10 %), *Cyanobacteria* (7 %) та *Actinobacteria* (6 %), які функціонально переважно є гетеротрофами і здатні деградувати ароматичні сполуки. Цим же дослідженням встановлено, що найпоширенішими фагами у спільноті коралових мікроорганізмів є дволанцюгові ДНК-вмісні мікрофаги та еукаріотні віруси, які інфікують морських еукаріотів [85]. Зазначений аналіз є першим ґрунтовним підходом до визначення ролі мікроорганізмів у виживанні коралів у довкіллі та формуванні коралових рифів.

Дані, отримані в перших секвенованих метагеномних проектах, свідчать, по-перше, що чим складнішою у фізико-хімічному сенсі є екосистема, тим складніша її мікробна спільнота. По-друге, переважна більшість мікроорганізмів залишається неідентифікованою і їхні функції теж невідомі. По-третє, сучасними комп'ютерними програмами важко збирати у сенсові послідовності секвеновані фрагменти ДНК.

Зважаючи на все це, необхідні нові нетрадиційні підходи для реконструювання мікробних спільнот у складних природних зразках. Оскільки довкілля, особливо ґрунт, є джерелом потрібних генів для виробництва ліків, ферментів та інших важливих для господарства і промисловості біотехпродуктів, є сподівання, що біотехкомпанії більше коштів інвестуватимуть у розвиток мікробної екології, ніж академічний сектор і урядові організації, які опікуються природоохоронними проблемами.

Автори висловлюють щире вдячність Олегу Реві (університет м. Преторія, ПАР) за критичні зауваження до огляду.

L. P. Ovcharenko, N. O. Kozyrovska

Metagenomic analysis for microbial ecology and biotechnology

Summary

*Metagenomics studies the collective genomes of the environmental microorganisms using methods of molecular genetics, bioinformatics, proteomics, and metabolomics. Methagenomic analysis gives a possibility to reconstruct microbial communities, including unculturable microorganisms of practically all ecosystems, to define their functions, interrelationship with macroorganisms etc. In the nearest time a search for novel genes for biotechnology and pharmaceutical industry will be a key event.*

*Keywords: metagenomics, collective of microorganisms, microbial ecology.*

Л. П. Овчаренко, Н. А. Козировская

Метагеномний аналіз для мікробної екології і біотехнології

Резюме

*Метагеноміка изучает коллективные геномы микроорганизмов окружающей среды методами молекулярной генетики и других отраслей биологической науки (биоинформатика, протеомика, метаболомика). Метагеномный анализ дает возможность реконструировать микробные сообщества, в том числе некультивируемых микроорганизмов, практически любых экосистем, определить их функции, взаимоотношения с макроорганизмами и т. п. В ближайшие годы ключевым в метагеномике будет поиск новых генов для биотехнологической и фармацевтической промышленности.*

*Ключевые слова: метагеномика, микробная экология, сообщества микроорганизмов.*

#### PERELIK LITERATURY

1. Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*—2004.—**68**, N 4.—P. 669–685.
2. Torsvik V., Daa F. L., Sandaa R. A., Ovreas L. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments // *J. Biotechnol.*—1998.—**64**, N 1.—P. 53–62.
3. Sanger F., Nicken S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—**74**, N 12.—P. 5463–5467.
4. Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., Pace N. R. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences // *Science.*—1984.—**224**, N 4647.—P. 409–411.
5. Hugenholtz P., Pace N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach // *Trends Biotechnol.*—1996.—**14**, N 6.—P. 190–197.
6. Zuckerkandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history // *J. Theor. Biol.*—1965.—**8**—P. 357–366.
7. Janda J. M., Abbott S. L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls // *J. Clin. Microbiol.*—2007.—**45**, N 9.—P. 2761–2764.
8. Stephan R. J., Atlas R. M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental

- samples// *Appl. Environ. Microbiol.*–1988.–**54**, N 9.– P. 2185–2191.
9. *Laguerre G., Allard M.-R., Revoy F., Amarger N.* Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes // *Appl. Environ. Microbiol.*–1994.–**60**, N 1.–P. 56–63.
  10. *De Boer S. N., Copeman R. J.* Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring root disease // *Can. J. Plant Sci.*–1974.–**54**, N 1.–P. 115–122.
  11. *Fisher M. M., Triplett E. W.* Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities // *Appl. Environ. Microbiol.*–1999.–**65**, N 10.–P. 4630–4636.
  12. *Muyzer G. A., de Waal E. C., Uitterlinden A. G.* Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.*–1993.–**59**, N 3.–P. 695–700.
  13. *Liu W. T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. J.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.*–1997.–**63**, N 3.–P. 4516–4522.
  14. *Xiao W., Oefner P. J.* Denaturing high-performance liquid chromatography: A review // *Hum. Mutat.*–2001.–**17**, N 6.– P. 439–474.
  15. *Weber A. P. M., Weber K. L., Carr K., Wilkerson C., Ohlrogge J. B.* Sampling the Arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing // *Plant Physiol.*– 2007.– **144**, N 1.–P. 32–42.
  16. *Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y. J., Chen Z.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature.*–2005.–**437**, N 7057.–P. 376–380.
  17. *Ahmadian A., Ehn M., Hober S.* Pyrosequencing: history, biochemistry and future // *Clin. Chim. Acta.*–2006.–**363**, N 1–2.–P. 83–94.
  18. *Mitra R. D., Church G. M.* *In situ* localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules // *Nucl. Acids Res.*–1999.–**27**, N 24.–e34.
  19. *Lagerquist J., Zwolak M., Di Venta M.* Fast DNA sequencing via transverse electronic transport // *Nano Lett.*–2006.– **6**– P. 779–788.
  20. *Raes J., Korb J. O., Lercher M. J., von Mering C., Bork P.* Prediction of effective genome size in metagenomic samples // *Genome Biol.*–2007.–**8**, N 1.–R10.
  21. *Quaiser A., Ochsenreiter T., Klenk H. P., Kletzin A., Treusch A. H., Meure G., Eck J., Sensen C. W., Schleper C.* First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil // *Environ. Microbiol.*–2002.–**4**, N 10.–P. 603–611.
  22. *Yang Z. H., Xaio Y., Zeng G. M., Xu Z. Y., Liu Y. S.* Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*–2007.–**74**, N 4.–P. 918–925.
  23. *Stein J. L., Marsh T. L., Wu K. Y., Shizuya H., DeLong E. F.* Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon // *J. Bacteriol.*–1996.–**78**, N 2.– P. 591–599.
  24. *Huson D. H., Auch A. F., Qi J., Schuster S. C.* MEGAN analysis of metagenomic data // *Genome Res.*–2007.–**3**, N 2.– P. 377–389.
  25. *Reva O. N., T?mmler B.* Global features of sequences of bacterial chromosomes, plasmids and phages revealed by analysis of oligonucleotide usage patterns // *BMC Bioinformatics.*–2004.–**5**–P. 90.
  26. *Reva O. N., Tummler B.* Differentiation of regions with atypical oligonucleotide composition in bacterial genomes // *BMC Bioinformatics.*–2005.–**6**–P. 251.
  27. *Sandberg R., Winberg G., Branden C. I., Kaske A., Ernberg I., Coster J.* Capturing whole-genome characteristics in short sequences using a naïve Bayesian classifier // *Genome Res.*–2001.–**11**, N 8.–P. 1404–1409.
  28. *He P. A.* The sieve ratio for characterization and similarity analysis of DNA sequences // *Combinat. Chem. and High Through. Screen.*–2005.–**8**, N 5.–P. 449–453.
  29. *Teeling H., Meyerdierks A., Bauer M.* Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments // *Environ. Microbiol.*–2004.–**6**, N 9–P. 938–947.
  30. *Williamson L. L., Borlee B. R., Schloss P. D., Guan C., Allen H. K., Handelsman J.* Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor // *Appl. Environ. Microbiol.*–2005.–**71**, N 10.– P. 6335–6344.
  31. *Uchiyama T., Abe T., Ikemura T., Watanabe K.* Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes // *Nat. Biotechnol.*–2005.–**23**, N 1.–P. 88–93.
  32. *Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Science.*–1995.–**270**, N 5235.–P. 467–470.
  33. *Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T., Liles M., Loiacono K., Lynch B., MacNeil B., Minor C., Tiong C., Gilman M., Osburne M., Clardy C., Handelsman J., Goodman R.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms // *Appl. Environ. Microbiol.*– 2000.–**66**, N 6.–P. 2541–2547.
  34. *Wagner M., Nielsen P., Loy A., Nielsen J., Daims H.* Linking microbial community structure with function: fluorescence *in situ* hybridization-microradiography and isotope arrays // *Curr. Opin. Microbiol.*–2006.–**17**, N 1.–P. 1–9.
  35. *Hatamoto M., Imachi H., Ohashi A., Harada H.* Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges // *Appl. Environ. Microbiol.*–2007.–**73**, N 4.–P. 1332–1340.
  36. *Ariesyady H. D., Ito T., Yoshiguchi K., Okabe S.* Phylogenetic and functional diversity of propionate-oxidizing bacteria in an anaerobic digester sludge // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*– 2007.–**75**, N 3.– P. 673–679.
  37. *Whiteley A. S., Thomson B., Lueders T., Manefeld M.* RNA stable-isotope probing // *Nat. Protocols.*–2007.–**2**, N 4.– P. 838–844.
  38. *Bernard L., Mougél C., Maron P.-A., Nowak V., Leveque J., Henault C., Haichar F. E. Z.* Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from <sup>13</sup>C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques // *Environ. Microbiol.*–2007.–**9**, N 3.– P. 752–764.
  39. *Adamczyk J., Hesselsoe M., Iversen N., Horn M., Lehner A., Nielsen P., Schloter M., Roslev P., Wagner M.* The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure

- and function // *Appl. Environ. Microbiol.*—2003.—**69**, N 11.—P. 6875–6887.
40. *Schmeisser C., Steele H., Streit W. R.* Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*—2007.—**75**, N 5.—P. 955–962.
  41. *Schloss P. D., Handelsman J.* Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot // *Genome Biol.*—2005.—**6**, N 8.—P. 229.
  42. *Gabor E. M., Alkema W. B. L., Janssen D. B.* Quantifying the accessibility the metagenome by random expression cloning techniques // *Environ. Microbiol.*—2004.—**6**, N 9.—P. 879–886.
  43. *Ferrer M., Golyshina O. V., Chernikova T. N., Khachane A. N.* Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora // *Environ. Microbiol.*—2005.—**7**, N 12.—P. 1996–2010.
  44. *Rhee J.-K., Ahn D., Kim L.-G., Oh J.* New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library // *Appl. Environ. Microbiol.*—2005.—**71**, N 2.—P. 817–825.
  45. *Lopez-Cortes N., Reyes-Duarte D., Beloqui A., Polaina J., Ghazi I., Golyshina O. V., Ballesteros A., Golyshin P. N., Ferrer M.* Catalytic role of conserved HQGE motif in the CE6 carbohydrate esterase family // *FEBS Lett.*—2007.—**581**, N 24.—P. 4657–4662.
  46. *Richardson T. H., Tan X., Frey G., Callen W., Cabell M., Lam D., Macomber J., Short J., Robertson T., Miller C.* A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase // *Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 29.—P. 26501–26507.
  47. *Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K.-E., Streit W. R.* Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome // *Appl. Environ. Microbiol.*—2003.—**69**, N 10.—P. 6235–6242.
  48. *Yun J., Kang S., Park S., Yoon H., Kim M., Heu S., Ryu S.* Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library // *Appl. Environ. Microbiol.*—2004.—**70**, N 12.—P. 7229–7235.
  49. *Grant S., Sorokin D. Y., Grant W. D., Jones B. E., Heaphy S.* A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulose enrichment cultures and identification of cellulose genes from these cultures // *Extremophiles.*—2004.—**8**, N 5.—P. 421–429.
  50. *Voget S., Steele H. L., Streit W. R.* Characterization of a metagenomic derived halotolerant cellulose // *J. Biotechnol.*—2006.—**126**, N 1.—P. 26–36.
  51. *Cottrell M. T., Moore J. A., Kirchman D. L.* Chitinases from uncultured marine microorganisms // *Appl. Environ. Microbiol.*—1999.—**65**, N 6.—P. 2553–2557.
  52. *Hooster F., Schmitz J., Daniel R.* Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*—2005.—**66**, N 4.—P. 434–442.
  53. *Brennan Y.-L., Callen W. N., Christoffersen L., Dupree P., Goubet F., Healey S., Hernandez M., Keller M., Ke Li, Palackal N., Sittenfeld A., Tamayo G., Wells S., Hazlewood G., Mathur E., Short J., Robertson D., Brian A.* Steer unusual microbial xylanases from insect guts // *Appl. Environ. Microbiol.*—2004.—**70**, N 6.—P. 3609–3617.
  54. *Lee C. C., Kibblewhite-Accinelli R. E., Wagschal K., Robertson G. H., Wong D. W.* Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library // *Extremophiles.*—2006.—**10**, N 4.—P. 295–300.
  55. *Ferrer M., Beloqui A., Golyshina O. V., Plou F. J., Neef A., Chernikova T. N., Fernandez-Arrojo L., Ghazi I., Ballesteros A.* Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome // *Biotechnol. J.*—2007.—**2**, N 2.—P. 207–213.
  56. *Gill S. R., Pop M., DeBoy R., Eckburg P., Turnbaugh P., Buck S., Gordon J., Relman D., Fraser-Liggett C., Nelson K.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome // *Science.*—2006.—**312**, N 5778.—P. 1355–1359.
  57. *Lim B., Yeung P., Cheng C., Hill J. E.* Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria // *The ISME J.*—2007.—**1**, N 4.—P. 321–330.
  58. *Entcheva P., Liebl W., Johann A., Hartsch T., Streit W.* Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia // *Appl. Environ. Microbiol.*—2001.—**67**, N 1.—P. 89–99.
  59. *Eschenfeldt W., Stols L., Rosenbaum H., Khambatta Z., Quate-Randall L., Shan Wu, Kilgore D., Trent J., Donnelly M.* DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases // *Appl. Environ. Microbiol.*—2001.—**67**, N 9.—P. 4206–4214.
  60. *DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W., Wong K., Chaplin J., Hanson S. R., Farwell B., Nicholson L., Rand C. L., Weiner D. P., Robertson D. E., Burk M. J.* An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives // *J. Amer. Chem. Soc.*—2002.—**124**, N 31.—P. 9024–9025.
  61. *Robertson D., Chaplin J., DeSantis G., Podar M., Madden M., Chi E., Richardson T., Milan A., Miller M., Weiner D., Wong K., McQuaid J., Farwell B., Preston L., Tan X., Snead M., Keller M., Mathur E., Kretz P., Burk J. M.* Short exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis // *Appl. Environ. Microbiol.*—2004.—**70**, N 4.—P. 2429–2436.
  62. *Knietsch A., Bowien S., Whited G., Gottschalk G., Rolf D.* Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures // *Appl. Environ. Microbiol.*—2003.—**69**, N 6.—P. 3048–3060.
  63. *Beloqui A., Pita M., Polaina J., Martinez-Arias A., Golyshina O. V., Zumarraga M., Yakimov M. M., Garcia-Arellano H., Alcalde M., Fernandez V. M., Elborough K., Andreu J. M., Ballesteros A., Plou F. J., Timmis K. N., Ferrer M., Golyshin P. N.* Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships // *J. Biol. Chem.*—2006.—**281**, N 32.—P. 22933–22942.
  64. *Gupta R., Berg Q., Lorenz P.* Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*—2002.—**59**, N 1.—P. 15–32.
  65. *Wang C., Meek D., Panchal P., Boruvka N., Archibald F., Driscoll B., Charles T.* Isolation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism genes from complex microbial communities by phenotypic complementation of bacterial mutants // *Appl. Environ. Microbiol.*—2006.—**72**, N 1.—P. 384–391.
  66. *Brady S., Chao C., Clardy J.* Long-chain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA // *Appl. Environ. Microbiol.*—2004.—**70**, N 11.—P. 6865–6870.
  67. *Venter J. C., Remington K., Heidelberg J., Halpern A., Rusch D., Eisen J., Wu D., Paulsen I., Nelson K., Nelson W., Fouts D., Levy S., Knap A., Lomas M., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y., Smith H.* Environmental genome

- shotgun sequencing of the Sargasso Sea // *Science*.–2004.–**304**, N 5667.–P. 66–74.
68. McHardy A. C., Martin H. G., Tsirigos A., Hundegoltz P., Rigoutsos I. Accurate phylogenetic classification of variable-length DNA fragments // *Nat. Meth.*–2007.–**4**.–P. 63–72.
69. von Mering C., Hugenholtz P., Raes J., Tringe S. G., Doerks T., Jensen L. J., Ward N., Bork P. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments // *Science*.–2007.–**315**, N 5815.–P. 1126–1130.
70. Angly F., Felts B., Breitbart M., Salamon P., Edwards R., Carlson C., Chan A., Haynes M., Kelley S., Liu H., Mahaffy J., Mueller J., Nulton J., Olson R., Parsons R., Rayhawk S., Suttle C., Rohwer F. The marine viromes of four oceanic regions // *PLoS Biol.*–2006.–**4**.–e368.
71. Tyson G. W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E. E., Ram R. J. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genome from the environment // *Nature*.–2004.–**428**, N 6978.–P. 37–43.
72. Ram R. J., Verkberkmoes N. C., Thelen M. P., Tyson G. W., Baker B. J., Blake R. C. 2nd, Shah M., Hettich R. L., Banfield J. F. Community proteomics of a natural microbial biofilm // *Science*.–2005.–**308**, N 5730.–P. 1915–1920.
73. Gans J., Wolinsky M., Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil // *Science*.–2005.–**309**, N 5739.–P. 1387–1390.
74. Daniel R. The metagenomics of soil // *Nat. Rev. Microbiol.*–2005.–**3**, N 6.–P. 470–478.
75. Nakatsu C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis // *Soil Sci. Soc. Amer. J.*–2007.–**71**–P. 562–571.
76. Roesch L., Fulthorpe R., Riva A., Casella G., Hadwin A., Kent A., Daroub S., Camargo F., Farmerie W., Triplett E. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // *The ISME J.*–2007.–**1**, N 1.–P. 283–290.
77. Tringe S. G., von Mering C., Kobayashi A., Salamov A. Comparative metagenomics of microbial communities // *Science*.–2005.–**308**, N 5721.–P. 554–557.
78. Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L. Diversity of the human intestinal microbial flora // *Science*.–2005.–**308**, N 5728.–P. 1635–1638.
79. Okada M., Bothin C., Kanazawa K., Midtvedt T. Experimental study of the influence of intestinal flora on the healing of intestinal anastomoses // *Brit. J. Surg.*–1999.–**89**, N 7.–P. 961–965.
80. Dymock D., Weightman A. J., Scully C., Wade W. G. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses // *J. Clin. Microbiol.*–1996.–**34**, N 3.–P. 537–542.
81. Kroes I., Lepp P. W., Relman D. A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–1999.–**96**, N 25.–P. 14547–14552.
82. Sakamoto M., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries // *Microbiol. Immunol.*–2000.–**44**, N 8.–P. 643–652.
83. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucl. Acids Res.*–2000.–**28**, N 1.–P. 27–30.
85. Tatusov R. L., Fedorova N. D., Jackson J. D., Jacobs A. R., Kiryutin B., Koonin E. V., Krylov D. M., Mazumder R., Mekhedov S. L., Nikolskaya A. N., Rao B. S., Smirnov S., Sverdlov A. V., Vasudevan S., Wolf Y. I., Yin J. J., Natale D. A. The COG database: an updated version includes eukaryotes // *BMC Bioinformatics.*–2003.–**4**.–P. 41.
86. Wegley L., Edwards R., Rodrigues-Brito B., Liu H., Rohwer F. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides* // *Environ. Microbiol.*–2007.–**9**, N 11.–P. 2707–2719.

УДК 579.25 + 579.29  
Надійшла до редакції 10.01.08