

Номер 5

ISSN 0032-180X

Май 2023



ПОЧВОВЕДЕНИЕ

www.sciencejournals.ru

Журнал основан в январе 1899 г. На его страницах публикуются оригинальные статьи, обзоры; отражаются различные аспекты теоретических и экспериментальных исследований генезиса, географии, физики, химии, биологии, плодородия почв; освещаются результаты теоретических и экологических исследований в глобальном и региональном планах.



СОДЕРЖАНИЕ

Номер 5, 2023

Тема номера: **БИОЛОГИЯ ПОЧВ**

Редактор номера А.Л. Степанов

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ

Разнообразие бактерий, культивируемых из аридных почв и пород в условиях дефицита доступной воды

В. С. Чепцов, А. А. Белов, И. В. Сотников 525

Мицелиальный компонент эутрофных торфяных почв в зоне активной деструкции органического детрита

*А. В. Головченко, Т. А. Грачева, Т. А. Семенова, А. А. Морозов,
С. Р. Самигуллина, Т. В. Глухова, Л. И. Инишева* 536

Биотехнологический потенциал прокариотного компонента современных, реликтовых почв и грунтов Антарктиды

*Н. А. Манучарова, М. А. Коваленко, М. Г. Алексеева,
А. Д. Бабенко, А. Л. Степанов* 550

ЭКОЛОГИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторное исследование влияния солей аммония и лантана на окисление метана и состав микробных сообществ в дерново-подзолистой почве

И. К. Кравченко, Л. Р. Сизов, Л. В. Лысак 567

Влияние внесения минерального азота и глюкозы на температурную чувствительность (Q_{10}) минерализации органического вещества почв

А. И. Матвиенко, М. С. Громова, О. В. Меняйло 579

Исследование микробного состава бентонитов двух месторождений

Д. Д. Кошелева, В. С. Чепцов, А. Л. Степанов, И. И. Толпешта, В. В. Крупская 586

Оценка хитинолитической и антибиотической активности актиномицетов *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468

*Г. А. Терезулова, О. Н. Синёва, Н. Н. Маркелова, В. С. Садыкова,
Г. В. Уваров, М. А. Коваленко, Н. А. Манучарова* 594

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Новый продуцент боррелидина *Streptomyces rochei* 31Z-6 и его перспективы в защите растений

*И. Г. Широких, И. А. Остерман, Д. А. Лукьянов, В. И. Марина,
М. В. Бирюков, О. А. Белозерова, Е. Б. Гугля, А. А. Широких,
Я. И. Назарова, Н. А. Боков, Ю. В. Закалюкина* 603

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Влияние глифосата на биологическую активность и фитотоксичность дерново-подзолистой почвы в условиях краткосрочного модельного эксперимента

*Н. В. Костина, М. В. Горленко, К. А. Мазуров, О. И. Филиппова,
И. В. Плющенко, И. А. Родин, Н. А. Куликова* 613

Изменение бактериального сообщества почвы при разложении соломы в зависимости от содержания доступного органического вещества

О. В. Орлова, А. А. Кичко, Е. Л. Чирак, А. О. Зверев, Т. О. Лисина, Е. Е. Андронов 626

Влияние внесения соломы на состояние микробиома дерново-подзолистой почвы

*Д. А. Никитин, М. В. Семенов, Н. А. Ксенофонтова,
А. К. Тхакахова, И. В. Русакова, С. М. Лукин*

640

ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Обилие и разнообразие прокариотных сообществ пылеаэрозоля и городских почв на территории Москвы

*Л. В. Лысак, С. А. Шоба, Т. В. Прокофьева, А. М. Глушакова,
Н. В. Гончаров, А. А. Белов*

654

Коэффициенты пересчета содержания двухцепочечной ДНК в углерод микробной биомассы почв

Е. В. Чернышева, Ф. Форназьер, А. В. Борисов

664

Почвенный микробиом в зоне воздействия выбросов горно-металлургического комбината Печенганикель (Мурманская область)

М. В. Корнейкова, Д. А. Никитин

676

Contents

No. 5, 2023

SOIL BIOLOGY Editor: A.L. Stepanov

Taxonomic and Functional Diversity of Soil Microbes

- Diversity of Bacteria Cultured from Arid Soils and Sedimentary Rocks under Conditions of Available Water Deficiency
V. S. Cheptsov, A. A. Belov, and I. V. Sotnikov 525
- The Mycelial Component of Eutrophic Peat Soils in the Zone of Active Organic Detritus Decomposition
A. V. Golovchenko, T. A. Gracheva, T. A. Semenova, A. A. Morozov, S. R. Samigullina, T. V. Glukhova, and L. I. Inisheva 536
- Biotechnological Potential of Hydrolytic Prokaryotic Component in Soils
N. A. Manucharova, M. A. Kovalenko, M. G. Alekseeva, A. D. Babenko, and A. L. Stepanov 550
-

Ecology of Soil Microorganisms

- Laboratory Study of the Effect of Ammonium and Lanthanum Salts on Methane Oxidation and the Composition of Microbial Communities in Sod-Podzolic Soil
I. K. Kravchenko, L. R. Sizov, and L. V. Lysak 567
- Effect of Mineral Nitrogen and Glucose Application on Temperature Sensitivity (Q_{10}) of Mineralization of Soil Organic Matter
A. I. Matvienko, M. S. Gromova, and O. V. Menyailo 579
- Investigation of the Microbial Communities of Bentonites from Two Different Repositories under Different Temperature of Incubation
D. D. Kosheleva, V. S. Cheptsov, A. L. Stepanov, I. I. Tolpeshta, and V. V. Krupskaya 586
- Evaluation of the Chitinolytic and Antibiotic Activity of the *Streptomyces avidinii* INA 01467 and *Micromonospora aurantiaca* INA 01468
G. A. Teregulova, O. N. Sineva, N. N. Markelova, V. S. Sadikova, G. V. Uvarov, M. A. Kovalenko, and N. A. Manucharova 594
-

Physiologically Active Substances of Soil Microorganisms

- Biocontrol Potential of Novel Borrelidin-Producing *Streptomyces rochei* 31Z-6 Isolated from Israeli Soil
I. G. Shirokikh, I. A. Osterman, D. A. Lukianov, V. I. Marina, M. V. Biryukov, O. A. Belozerovala, E. B. Guglya, A. A. Shirokikh, Ya. I. Nazarova, N. A. Bokov, and Yu. V. Zakalyukina 603
-

Agricultural Microbiology

- Glyphosate Effects on Some Characteristics of Biological Activity and Phytotoxicity of Sod-Podzolic Soil in a Short-Term Model Experiment
N. V. Kostina, M. V. Gorenko, K. A. Mazurov, O. I. Filippova, I. V. Plyushchenko, I. A. Rodin, and N. A. Kulikova 613
- Soil Bacterial Community during Straw Decomposition Depending on the Amount of Available Organic Matter
O. V. Orlova, A. A. Kichko, E. L. Chirak, A. O. Zverev, T. O. Lisina, and E. E. Andronov 626

Effect of Fresh Organic Matter of Straw on Microbiological Parameters
of Sod-Podzolic Soil

*D. A. Nikitin, M. V. Semenov, N. A. Ksenofontova, A. K. Tkhakakhova,
I. V. Rusakova, and S. M. Lukin*

640

Soil Microbiome in Conditions of Anthropogenic Impact

Abundance and Diversity of Prokaryotic Communities of Dust Aerosol and Urban Soils
on the Territory of Moscow

*L. V. Lysak, S. A. Shoba, T. V. Prokof'eva, A. M. Glushakova,
N. V. Goncharov, and A. A. Belov*

654

Factors for Conversion of the Content of Double-Stranded DNA to Carbon
of Soil Microbial Biomass

E. V. Chernysheva, F. Fornasier, and A. V. Borisov

664

Soil Microbiome in the Impact Zone of the Pechenganikel Plant Emissions
(Murmansk Region)

M. V. Korneykova and D. A. Nikitin

676

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ

УДК 502.53:631.46

РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ИЗ АРИДНЫХ ПОЧВ И ПОРОД В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ДОСТУПНОЙ ВОДЫ

© 2023 г. В. С. Чепцов^{a, b, *}, А. А. Белов^a, И. В. Сотников^c

^aМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^bИнститут космических исследований РАН, ул. Профсоюзная, 84/32, Москва, 117997 Россия

^cИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр-т, 33, Москва, 119071 Россия

*e-mail: cheptcov.vladimir@gmail.com

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Проведено исследование разнообразия бактерий, выделенных из почвы пустыни Негев (Израиль, образец SN2) и осадочной породы пустыни Сахара (Тунис, образец Alg). Для оценки способности бактерий к метаболизму при различных уровнях доступности влаги и для более полного выявления бактериального разнообразия культивирование проводили на средах R2A с добавлением глицерина в различных концентрациях для установления определенного уровня активности воды (A_w) в среде в диапазоне от 1.0 до 0.9 (с шагом 0.01 A_w). После инкубации уникальные морфотипы культивируемых бактерий выделяли, описывали, идентифицировали с помощью секвенирования 16S рРНК и тестировали на способность к росту в градиенте A_w в чистых культурах. После инкубации и выделения было идентифицировано и протестировано 355 штаммов. Культивируемые бактерии обнаруживали на средах с A_w 0.95 и больше. При уменьшении A_w от 1 до 0.95 численность культивируемых бактерий уменьшалась от 10^5 и 10^7 КОЕ/г в образцах SN2 и Alg соответственно до 2×10^4 КОЕ/г в обоих исследованных образцах. В результате культивирования выделили представителей 34 родов бактерий, преимущественно филума Actinobacteria; доминировали представители родов *Arthrobacter*, *Kocuria* и *Pseudarthrobacter*. При этом выявили 38 штаммов с низким сходством нуклеотидных последовательностей с базами данных, вероятно, являющихся представителями ранее не описанных видов родов *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Cellulomonas*, *Conyzicola*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Okibacterium*, *Rathayibacter* и *Sphingomonas*. Тестирование штаммов на способность к росту в чистой культуре в градиенте значений A_w позволило обнаружить 18 штаммов родов *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Brachybacterium*, *Serratia* и *Leucobacter*, способных к росту на питательной среде с A_w 0.91. Проведенное исследование подтверждает, что пустынные почвы и породы являются депозитарием ранее не описанных видов бактерий, а также могут быть ценным источником биотехнологически перспективных штаммов.

Ключевые слова: активность воды, ксеротолерантность, актинобактерии, новые виды бактерий, пустынные почвы

DOI: 10.31857/S0032180X22601372, **EDN:** IFLUFI

ВВЕДЕНИЕ

Изучение изменений, происходящих в почвах и сопряженных системах при дефиците воды, является чрезвычайно актуальным [17, 48]. Исследование биоразнообразия микроорганизмов экстремобиосферы способствует пониманию основных физиологических процессов и роли микробных метаболитов в поддержании жизнеспособности клетки и сохранении метаболической активности в разнообразных физико-химических условиях, а также расширяет современные представления о разнообразии и геохимической роли ксеротолерантных организмов [28, 32, 39].

Засушливые экотопы – наиболее распространенные наземные экосистемы: на их долю приходится около 30% поверхности суши, из которых 7% являются гипераридными [9]. Кроме того, необходимо учитывать, что низкие температуры ограничивают доступность воды для микробных клеток [30], что расширяет область территорий, в почвах которых микробные сообщества на протяжении годичных или сезонных циклов испытывают дефицит доступной воды. Помимо низких температур на доступность воды для микроорганизмов влияет концентрация растворимых соединений в почвенных растворах, в частности,

при применении удобрений и в прикорневой зоне растений [24, 42, 47]. Это свидетельствует о широком распространении в биосфере экотопов и локусов, в которых микроорганизмы существуют в условиях недостатка доступной воды.

Нижняя граница активности воды (A_w), при которой показано сохранение репродуктивной активности микробными клетками, составляет около 0.585: в этих условиях развиваются ксерофильные микромицеты *Aspergillus penicillioides* [25, 52]. Считается, что функциональные границы биосферы по активности воды составляют от 1 до ≈ 0.60 ед., в то время как большинство микроорганизмов развивается в диапазоне A_w от 1 до 0.900 [23, 50]. Для почвенных микробных сообществ есть сведения о метаболической активности при A_w , равной 0.89 [34, 51]. Существуют данные о росте и размножении бактерий рода *Streptomyces* при активности воды, равной 0.5 [60, 61], и противоречащие исследования, свидетельствующие о невозможности репродукции данных видов при $A_w < 0.895$ [51].

Недавние исследования засушливых экосистем свидетельствуют о том, что почвы и породы пустынь могут рассматриваться в качестве депозитария ранее не описанных видов бактерий, а также содержат большое разнообразие продуцентов различных биологически активных веществ [22, 38]. При этом особое внимание уделяется поиску микроорганизмов, способствующих росту сельскохозяйственных растений [36, 43]. Выявление продуцентов биологически активных веществ, способных функционировать в условиях дефицита влаги, перспективно для множества прикладных направлений, включая выращивание сельскохозяйственных культур в аридных условиях и улавливание парниковых газов [7, 27, 43, 44].

Следует отметить, что исследования разнообразия устойчивых к низкой активности воды микроорганизмов в основном сфокусированы на изучении отдельных немногочисленных видов или штаммов. Изменения структуры культивируемых прокариотных сообществ при снижении активности воды практически отсутствуют.

Цель работы – изучение разнообразия культивируемых бактериальных сообществ в градиенте активности воды от 1 до 0.9 и оценка способности выделенных бактерий к росту при пониженной доступности воды.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись культивируемые бактериальные сообщества, выделенные из пустынной почвы и осадочной породы, отобранных в пустыне Негев ($30^{\circ}47' N$; $34^{\circ}46' E$; Израиль, условное обозначение образца SN2) и на

севере пустыни Сахара ($33^{\circ}25' N$; $9^{\circ}2' E$; Тунис, условное обозначение образца Alg) соответственно. Образцы SN2 и Alg отбирали асептично с глубины 5–10 и 0–10 см соответственно в стерильные полипропиленовые контейнеры. Согласно WRB, почва, отобранная в пустыне Негев, классифицируется как Aridic Calcisol [14].

Выделение культивируемых бактерий из почв и пород проводили на плотной питательной среде R2A [45]. Для создания различных значений активности воды использовали растворы глицерина, добавленные к питательной среде. Расчет значений A_w проводили по уравнению Норриша [23, 57]. Культивирование проводили на средах со значениями активности воды от 1 до 0.90 с шагом в 0.01 ед. активности. Посевы инкубировали в течение 42 сут при $+25^{\circ}C$, после чего проводили учет численности колониеобразующих единиц (КОЕ) по стандартной методике [1]. Посев проводили в трехкратной повторности.

После инкубации и учета численности КОЕ в каждом сообществе культивируемых бактерий учитывали число уникальных морфологических типов колоний, которые выделяли в чистую культуру. Всего из исследованных образцов при различных уровнях доступности воды (A_w) выделили 355 штаммов аэробных гетеротрофных бактерий. Чистые культуры пересевали на жидкую питательную среду R3A [45].

Для определения предельных значений A_w , при которых возможен рост выделенных штаммов, проводили культивирование исследуемых бактерий на жидкой питательной среде R3A в градиенте значений A_w от 1.0 (положительный контроль) до 0.9 с шагом в 0.01 ед. Инкубацию проводили в течение 42 сут при $+25^{\circ}C$ в трехкратной повторности, после чего регистрировали рост на среде с соответствующей активностью воды.

Для определения таксономической структуры сообществ культивируемых бактерий использовали методы амплификации фрагмента гена 16S рРНК с универсальными вырожденными праймерами, рестрикционный анализ ампликонов для выявления уникальных рибогенотипов бактерий и секвенирование по Сенгеру уникальных рибогенотипов.

Выделение ДНК чистых культур бактерий проводили по ранее описанной методике [3]: биомассу бактерий суспендировали в Трис-ЭДТА буферном растворе (рН 7.8) с 5% Triton X-100, суспензии инкубировали на водяной бане при температуре $100^{\circ}C$ в течение 15 мин, затем обрабатывали на гомогенизаторе при 5000 об./мин в течение 30 с. Далее полученную суспензию центрифугировали при 14000 об./мин в течение 3 мин, полученную надосадочную жидкость использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР.

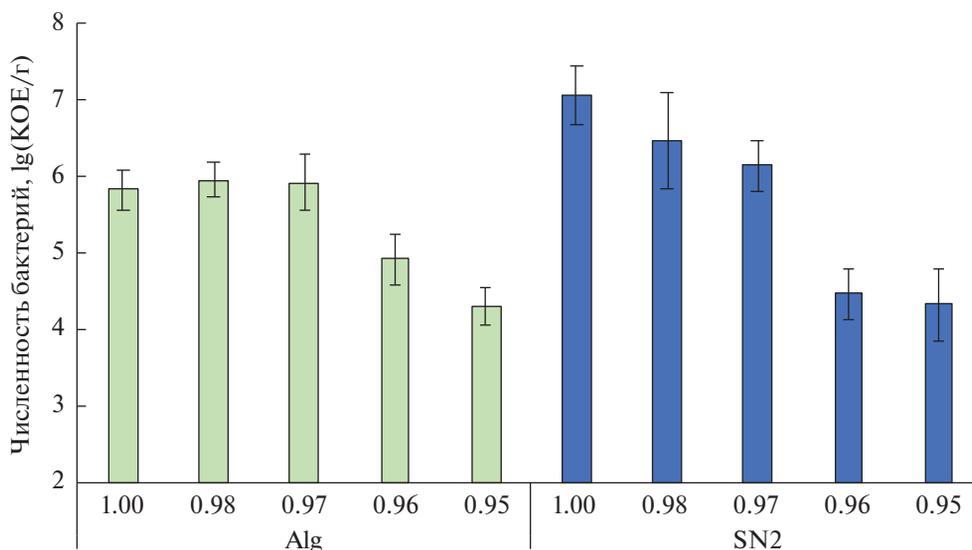


Рис. 1. Численность бактерий, культивируемых из образцов почвы пустыни Негев (SN2) и поверхностной осадочной породы пустыни Сахара (Alg) на средах с различными значениями активности воды.

Аmplификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с праймерной системой 27f + 537g по ранее описанной методике [3]. ПЦР-продуктов визуализировали в 1.5%-ном агарозном геле с ДНК-специфичным красителем бромистым этидием.

Для проведения риботипирования полученные ампликоны последовательно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Alu I, Hae III и Taq I (SibEnzyme, Россия) с сайтами рестрикции AG↑CT, GG↑CC и T↑CGA соответственно [13]. Ферментативные реакции проводили в соответствии с инструкциями производителя. Продукты рестрикции визуализировали в 2%-ном агарозном геле с ДНК-специфичным красителем бромистым этидием. Результаты рестрикции фиксировали с помощью системы гель-документирования Doc-Print II (Vilber Lourmat, Франция). Ампликоны с одинаковыми рестрикторными профилями относили к одному рибогенотипу.

Секвенирование фрагментов гена 16S рРНК проводили в научно-исследовательской компании Евроген (Россия). Редактирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Chromas Lite 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>), выравнивание, сравнение и идентификацию последовательностей выполняли с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) и алгоритма BLAST базы данных GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Полученные последовательности депонировали в базу данных GenBank под номерами OP673589–OP673681.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов программ R-Studio и Microsoft Office Excel. Коэффициенты несходства Брея–Кертиса рассчиты-

вали с использованием логарифмически преобразованных данных [31]; индексы Шеннона рассчитывали по описанной ранее методике [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность культивируемых бактерий. При культивировании на среде с A_w равной 1, численность бактерий составляла $(1.1 \pm 0.2) \times 10^7$ и $(6.7 \pm 0.6) \times 10^5$ КОЕ/г в образцах почвы пустыни Негев (SN2) и поверхностной осадочной породы пустыни Сахара (Alg) соответственно. При уменьшении A_w до 0.98–0.97 наблюдалось уменьшение количества бактерий, культивируемых из образца SN2, в 3–7 раз. Для образца Alg изменение числа КОЕ в этом диапазоне A_w не выявлено. При A_w 0.95 численность культивируемых бактерий была ниже в 100–1000 раз, чем при A_w 1 и достигала в обоих исследованных образцах значений $\sim 2 \times 10^4$ КОЕ/г (рис. 1). При меньших значениях активности воды макроколонии не развивались.

Численность аэробных гетеротрофных бактерий, культивируемых из образца SN2 на среде с A_w 1, близка к значениям, полученным ранее для данной почвы в ходе предыдущих исследований $\sim 3 \times 10^7$ КОЕ/г [14]. Исследования осадочных пород восточной части пустыни Сахара (юго-запад Египта) выявляли от 6.5×10^5 до 9.8×10^6 КОЕ/г культивируемых бактерий на различных питательных средах [3]. В целом, значения показателей обилия прокариот в образцах SN2 и Alg типичны для различных аридных экотопов [4, 19, 28, 29]. Сведения о численности бактерий при культивировании из каких-либо почв и пород на средах с пониженной доступностью воды в литературе отсутствуют.

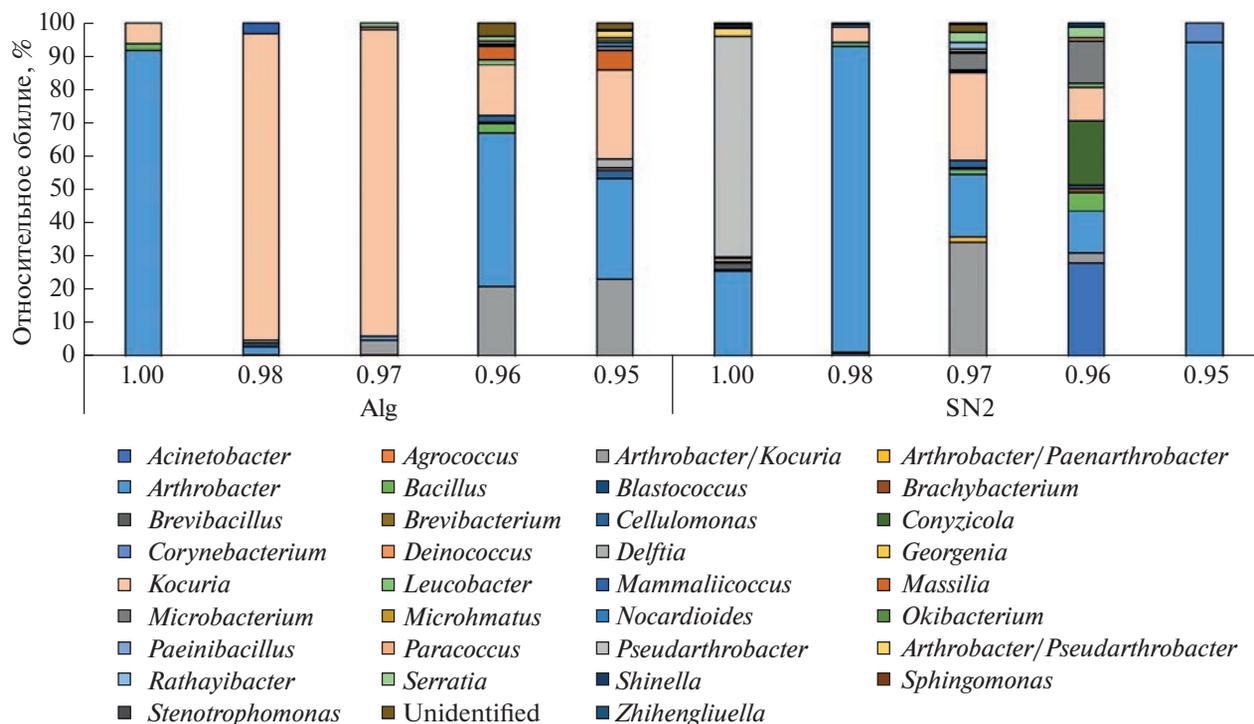


Рис. 2. Структура культивируемых бактериальных сообществ, выделенных из образцов почвы пустыни Негев (SN2) и осадочной породы пустыни Сахара (Alg) при различных значениях активности воды.

Разнообразие и структура культивируемых бактериальных сообществ. Доминирующими во всех выделенных сообществах являлись представители родов *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Pseudarthrobacter*. Всего из исследованных образцов при разных условиях были культивированы представители 34 родов и 67 видов бактерий, преимущественно представителей филума Actinobacteria (синоним Actinomycetota [40]), к которому относятся 23 из выявленных родов. Также были обнаружены бактерии филумов Firmicutes (роды *Bacillus*, *Mammaliococcus*, *Paenibacillus*), *Deinococcus-Thermus* (род *Deinococcus*), классов Alphaproteobacteria (*Paracoccus*, *Shinella*, *Sphingomonas*), Betaproteobacteria (*Massilia*, *Delftia*) и Gammaproteobacteria (*Serratia*, *Stenotrophomonas*). В обоих исследованных образцах было выявлено по 24 рода бактерий.

Из почвы пустыни Негев (SN2) на среде с A_w 1 были выделены бактерии 11 родов. При сниже-

нии A_w до 0.98 число культивируемых родов уменьшалось до 7 (рис. 2). При A_w 0.97 и 0.96 наблюдалось увеличение бактериального разнообразия: в этих условиях культивировались представители 12 и 13 родов соответственно. В то же время при уменьшении A_w до 0.95 были выделены бактерии лишь двух родов: *Arthrobacter* и *Corynebacterium*. Аналогичным образом изменялся индекс разнообразия Шеннона исследованных бактериальных сообществ (табл. 1).

В сообществах, выделенных из осадочной породы пустыни Сахара, количество родов культивируемых бактерий возрастало по мере снижения активности воды: на среде с A_w 1 были выделены представители трех родов бактерий (*Arthrobacter*, *Kocuria*, *Bacillus*); при A_w 0.98 и 0.97 обнаружено по 6 родов (доминировали представители рода *Kocuria*). Наибольшее разнообразие родов культивируемых бактерий было выявлено при наименьшей доступности воды – 9 и 12 родов при A_w 0.96 и 0.95 соответственно; при этом наибольшую долю в сообществах составляли представители родов *Arthrobacter* и *Kocuria*. Однако индекс Шеннона изменялся несколько иначе: при A_w 0.98 и 0.97 индексы были ниже, чем при A_w 1, несмотря на большее число культивируемых родов. Это обусловлено низкой выравненностью в данных бактериальных сообществах, т.е. высокой долей (91%) в сообществе единственного доминантного

Таблица 1. Индексы разнообразия Шеннона бактериальных сообществ, культивируемых при различных значениях A_w

Образец	Активность воды, A_w				
	1	0.98	0.97	0.96	0.95
SN2	1.26	0.66	2.23	2.36	1.20
Alg	1.02	0.50	0.51	2.28	2.56

Таблица 2. Матрицы коэффициентов несходства Брея–Кертиса исследованных микробных сообществ

SN2						Alg				
<i>Aw</i>	1	0.98	0.97	0.96	0.95	1	0.98	0.97	0.96	0.95
1	0	0.71	0.87	0.85	0.91	0	0.97	0.91	0.82	0.92
0.98	0.71	0	0.82	0.79	0.93	0.97	0	0.96	0.83	0.91
0.97	0.87	0.82	0	0.71	0.94	0.91	0.96	0	0.88	0.91
0.96	0.85	0.79	0.71	0	0.94	0.82	0.83	0.88	0	0.57
0.95	0.91	0.93	0.94	0.94	0	0.92	0.91	0.91	0.57	0

Таблица 3. Количество штаммов, предположительно являющихся неописанными видами бактерий, выделенных при различных условиях культивирования

<i>Aw</i>	Образец	Число штаммов	Родовая принадлежность
1	Alg	0	—
	SN	1	<i>Kocuria</i>
0.98	Alg	1	<i>Kocuria</i>
	SN	1	<i>Kocuria</i>
0.97	Alg	4	<i>Kocuria</i> , <i>Agrococcus</i>
	SN	13	<i>Brachy bacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rathayibacter</i>
0.96	Alg	3	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i>
	SN	9	<i>Arthrobacter</i> , <i>Brachy bacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Conyzicola</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Microbacterium</i>
0.95	Alg	6	<i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Okibacterium</i> , <i>Sphingomonas</i>
	SN	0	—

таксона. Наибольшие значения индекса Шеннона были характерны для наименьших *Aw*.

Высокие значения индекса Брея–Кертиса свидетельствуют о резкой перестройке структуры исследованных сообществ при каждом изменении активности воды (табл. 2). Данный индекс может варьировать от 0 до 1, и наименьшие значения индекса характерны для наиболее похожих сообществ. Для бактериальных сообществ, выделенных из образца SN2, наименьшие значения индекса составляли 0.71 для двух пар сообществ: выделенных при *Aw* 1 и 0.98 и при *Aw* 0.97 и 0.96. Наибольшее сходство было характерно для сообществ, выделенных из осадочной породы пустыни Сахара при *Aw* 0.96 и 0.95; индекс в этом случае был равен 0.57.

Таким образом, наибольшее разнообразие (как количество обнаруженных родов, так и индексы Шеннона) для обоих исследованных образцов наблюдалось при пониженных значениях *Aw*. Важно, что при выделении и идентификации чистых культур из исследованных образцов были обнаружены 38 штаммов бактерий (10.7% от исследованной выборки штаммов), характеризующихся низким сходством последовательностей

генов 16S рРНК с последовательностями базы данных GenBank [15], что может указывать на то, что данные организмы являются представителями ранее не описанных видов бактерий родов *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachy bacterium*, *Cellulomonas*, *Conyzicola*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Okibacterium*, *Rathayibacter* и *Sphingomonas*. Наименьшим сходством (95.6%) характеризовался штамм рода *Arthrobacter*, выделенный из образца Alg на среде с активностью воды, равной 0.95. Наибольшее количество штаммов, предположительно являющихся не описанными видами, было выделено из образца SN2 на средах с *Aw* 0.97 и 0.96 – 13 и 9 культур соответственно (табл. 3).

Ранее с применением культуральных и молекулярно-биологических методов неоднократно было показано доминирование бактерий филумов Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, в некоторых случаях Chloroflexi в почвах и породах пустынь [3, 4, 33, 53, 54]. Эти данные подтверждаются и в настоящем исследовании. Высокая представленность актинобактерий в пустынных почвах и породах, а также при культивировании в условиях дефицита доступной влаги, вероятно, обусловлена устойчивостью многих представителей этого филума к широкому спектру экстре-

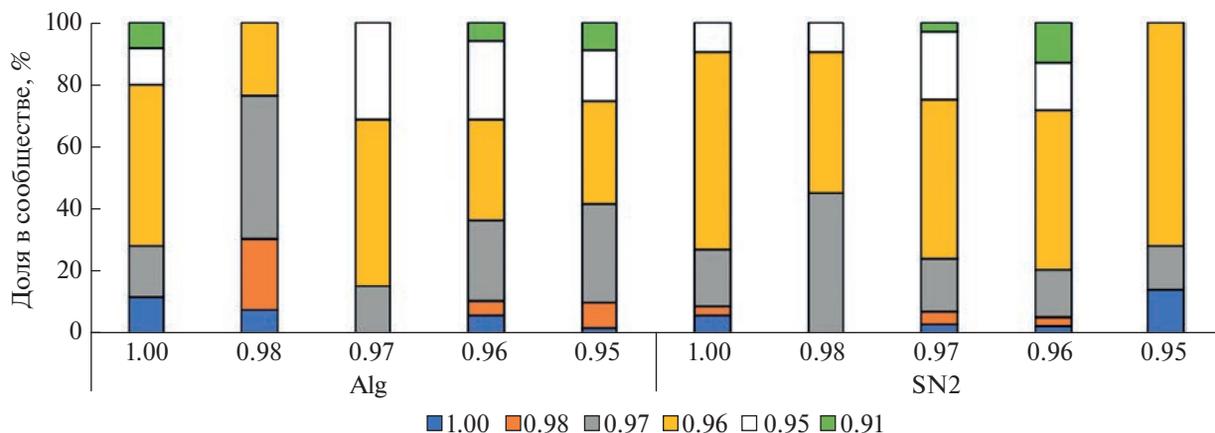


Рис. 3. Представленность бактерий с различными нижними границами значения A_w , при которых наблюдался рост в чистой культуре, в сообществах, выделенных при различных значениях активности воды.

мальных воздействий, включая повышенное содержание солей и сильных окислителей, высокие и низкие температуры, кислотность среды и др. [4, 5, 32, 59]. Для бактерий большинства родов, доминировавших в исследованных сообществах образцов SN2 и Alg, а также выделенных при A_w 0.95, показана высокая радиорезистентность [11, 13, 14, 16, 26, 41]. Следует отметить взаимосвязанность механизмов устойчивости к различным факторам, благодаря чему устойчивость к одному типу воздействия может способствовать выживанию и сохранению активности микроорганизма при другом типе воздействия [35, 55].

Полученные данные подтверждают существующую точку зрения о том, что аридные экосистемы содержат большой пул неописанных культивируемых микроорганизмов и, в частности, актинобактерий [22, 38]. В настоящее время предлагаются и разрабатываются подходы для выделения и описания этого микробного пула. Так, недавно показано, что применение традиционного метода посева, но с использованием нескольких питательных сред в градиенте концентраций, может быть эффективно для выделения неописанных видов бактерий. Таким путем из образцов почвенных корочек пустыни Табернас (Испания) было выделено 254 штамма, из которых 31% предположительно относились к неописанным видам бактерий [33]. Используемый нами подход может являться как альтернативой указанному выше методу, так и применяться в сочетании с ним, что может быть эффективно при поиске новых таксонов микроорганизмов.

Способность чистых культур к росту при различных значениях A_w . Все выделенные культуры исследовали на предмет способности к росту при различных значениях активности воды. На рис. 3 изображена представленность бактерий с различными нижними границами значения A_w , при ко-

торых наблюдался рост в чистой культуре, в сообществах, выделенных при различных значениях активности воды. Из всей исследованной выборки 4, 5, 24, 45, 17 и 5% штаммов были способны к росту в чистой культуре при A_w не ниже 1, 0.98, 0.97, 0.96, 0.95 и 0.91 соответственно. Штаммы, для которых граничные значения A_w были равны 0.92–0.94, отсутствовали. В большинстве сообществ культивируемых бактерий, независимо от A_w , при которой они были выделены, преобладали бактерии, способные к росту в чистой культуре при A_w 0.96.

Зависимостей между значением A_w , при котором было выделено сообщество, и значениями A_w , при которых способны расти штаммы из этого сообщества, не обнаружено. Полученные результаты указывают на то, между значениями A_w , при которых выделен каждый конкретный штамм, и его способностью к росту в чистой культуре на средах с различным уровнем доступности воды нет прямой связи. В частности, в нескольких выделенных сообществах выявлены культуры, способные к росту при A_w 0.91, в то время как при первичном выделении из почв и осадочных пород рост бактерий при соответствующем значении активности воды не обнаружен. В то же время для многих исследованных штаммов наблюдалась способность к росту при более низких A_w при первичном выделении из природных образцов и потеря способности к росту в этих условиях в чистых культурах. Это может быть объяснено различиями в условиях культивирования (первичное выделение на плотной среде R2A, субкультивирование и тестирование на жидкой среде R3A). Также нельзя исключить некоторое влияние микроэлементов и метаболитов, содержащихся в природных образцах и вносимых на поверхность питательной среды при посеве. Известно, что ряд веществ, содержащихся в почвах и породах, способен ока-

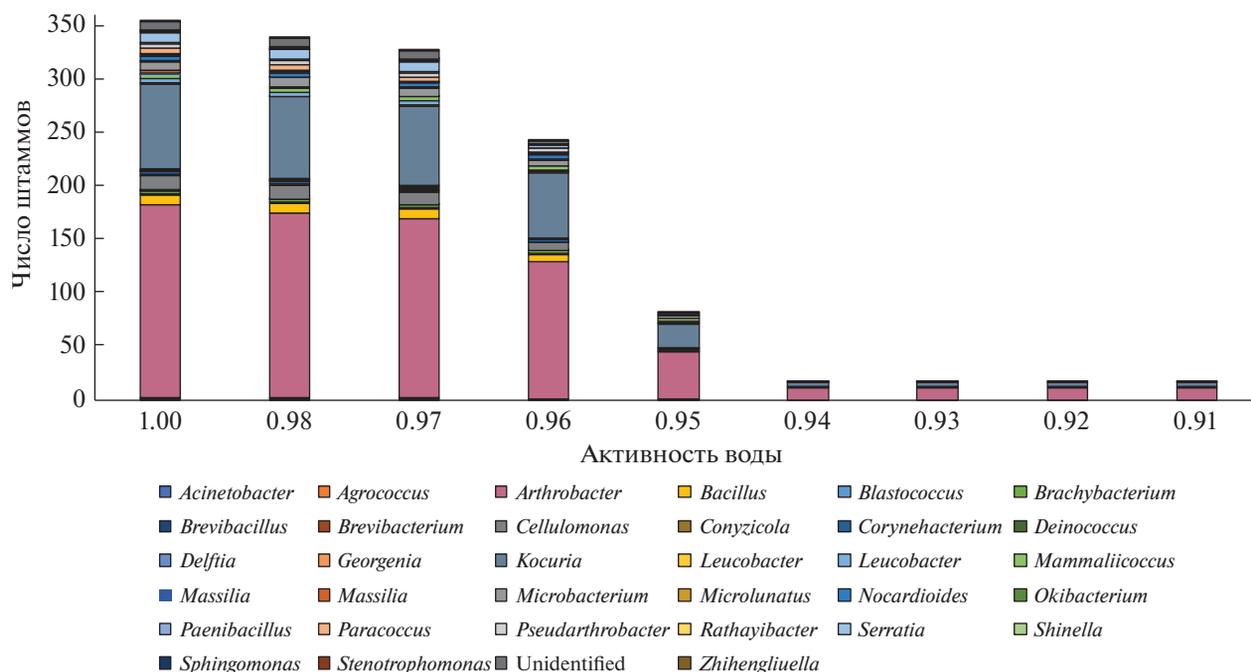


Рис. 4. Способность выделенных бактерий к росту в чистой культуре при различных значениях активности воды.

зывать стимулирующее воздействие на рост бактерий, а также способствовать функционированию микробных клеток в стрессовых условиях [18, 20].

Анализ коллекции выделенных из образцов SN2 и Alg бактерий выявил, что при активности воды от 1.0 до 0.96 происходит постепенное уменьшение количества штаммов и разнообразия бактерий, способных к росту в данных условиях; при A_w 0.95 происходит резкое сокращение числа культур, способных к росту. В диапазоне A_w 0.94–0.91 росли представители пяти родов бактерий *Arthrobacter*, *Brachy bacterium*, *Kocuria*, *Leucobacter* и *Serratia* (рис. 4). Ранее показано, что по крайней мере некоторые представители этих родов обладают ксеротолерантными свойствами [8, 12, 37, 46, 58].

Отметим, что в целом большинство бактерий не способно к росту при A_w ниже 0.95–0.94 [10, 21, 49]. В связи с этим штаммы, проявившие способность к росту при A_w 0.91, могут представлять значительный интерес как с точки зрения изучения механизмов ксеротолерантности, так и с биотехнологической позиции, особенно в случае продукции данными штаммами каких-либо промышленно значимых соединений. Анализ продукции ряда ферментов выявленными устойчивыми штаммами предполагается в продолжении исследования.

Внимания заслуживает и тот факт, что некоторые штаммы в чистой культуре могут расти при пониженной активности воды по сравнению с

условиями выделения. Так, некоторые штаммы, растущие в чистой культуре при A_w 0.91, были выделены на среде с A_w 1. В то же время некоторые исследования по поиску экстремотолерантных микроорганизмов сфокусированы на создании в начале эксперимента довольно строгих селективных условий, выделению небольшого количества предположительно наиболее устойчивых культур и их дальнейшей характеристике [2, 35, 56]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение подобного подхода может препятствовать обнаружению некоторых устойчивых микроорганизмов; в то же время очевидно, что характеристика большого числа штаммов значительно более трудоемка и не всегда технически возможна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование биоразнообразия и структуры бактериальных комплексов двух аридных экосистем при культивировании на средах с различными значениями активности воды. В ходе работы выделено и идентифицировано 355 штаммов бактерий, относящихся к 34 родам. Полученные данные дополняют современные знания о микробном разнообразии аридных экотопов.

Установлено, что при изменении A_w от 1 до 0.95 численность культивируемых бактерий уменьшается на 2–3 порядка. Снижение доступности влаги с шагом A_w 0.01 приводило к резким перестройкам таксономической структуры мик-

робных сообществ. При этом показатели биоразнообразия сначала снижались (при A_w 0.98) и затем возрастали и достигали наибольших значений при A_w 0.95–0.96. Во всех выделенных сообществах доминировали представители родов *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Pseudarthrobacter*.

В результате работы получено 38 бактериальных культур, которые могут являться представителями не описанных ранее видов бактерий. Показано, что проведение культивирования с градиентом значений A_w способствует выявлению существенно большего культивируемого разнообразия, что может применяться для поиска новых видов микроорганизмов, в том числе в сочетании с существующими подходами. Обнаружен ряд штаммов родов *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Kocuria*, *Leucobacter* и *Serratia*, способных расти при A_w 0.91; эти штаммы могут быть перспективны для изучения механизмов ксеротолерантности, а также с биотехнологической точки зрения.

Полученные результаты в совокупности с литературными данными указывают на то, что в лабораторных условиях преимущественно актинобактерии демонстрируют способность к росту в условиях дефицита доступной влаги. Учитывая их высокую устойчивость к УФ- и ионизирующему излучению, высушиванию, окислительному и солевому стрессу, колебаниям температуры, pH и другим факторам окружающей среды, филум Actinobacteria можно рассматривать как один из ключевых таксонов, представители которого способны сохранять метаболическую активность в условиях дефицита влаги.

Проведенное исследование подтверждает данные о том, что экстремальные экосистемы, в частности, пустынные почвы и породы, являются депозитарием ранее не описанных видов бактерий, а также могут быть ценным источником биотехнологически перспективных штаммов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-664.2021.1.4, а также при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект № 075-15-2021-1396 (в части тестирования чистых культур бактерий на способность к росту при низкой доступности воды). Анализ данных выполнен в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, тема № 2, номер ЦИТИС 121040800174–6 “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов А.А., Чепцов В.С., Лысак Л.В. Методы идентификации почвенных микроорганизмов. М.: МАКС Пресс, 2020. 196 с.
2. Albdaawi R.N., Khyami-Horani H., Ayad J.Y., Alananbeh K.M., Al-Sayaydeh R. Isolation and characterization of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria from durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) cultivated in saline areas of the dead sea region // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P 1639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01639>
3. Belov A.A., Cheptsov V.S., Vorobyova E.A. Soil bacterial communities of Sahara and Gibson deserts: Physiological and taxonomical characteristics // AIMS Microbiol. 2018. V. 4. № 4. P. 685. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.685>
4. Belov A.A., Cheptsov V.S., Vorobyova E.A., Manucharova N.A., Ezhelev Z.S. Stress-tolerance and taxonomy of culturable bacterial communities isolated from a central Mojave Desert soil sample // Geosciences. 2019. V. 9 № 4. P. 166. <https://doi.org/10.3390/geosciences9040166>
5. Belov A.A., Cheptsov V.S., Manucharova N.A., Ezhelev Z.S. Bacterial communities of Novaya Zemlya archipelago ice and permafrost // Geosciences. 2020. V. 10. № 2. P. 67. <https://doi.org/10.3390/geosciences10020067>
6. Bianchi M.A., Bianchi A.J. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement // Microb. Ecol. 1982. V. 8. № 1. P. 61–69. <https://doi.org/10.1007/BF02011462>
7. Bose H., Satyanarayana T. Microbial carbonic anhydrases in biomimetic carbon sequestration for mitigating global warming: prospects and perspectives // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 1615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01615>
8. Brown A. Microbial water stress // Bacteriol. Rev. 1976. V. 40. № 4. P. 803–846. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.803-846.1976>
9. Bull A.T. Actinobacteria of the extremobiosphere // Extremophiles Handbook / Ed. K. Horikoshi Springer, 2011. P. 1203–1240. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>
10. Cervenka L., Vytrasova M., Jelinek D., Brezina P. Determination of minimum water activity values for the survival of bacteria in a culture medium // Bull. Food Res. 2002. V. 41. № 1. P. 59–68. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SK2002000296>
11. Chanal A., Chapon V., Benzerara K., Barakat M., Christen R., Achouak W., Heulin T. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 3. P. 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00921.x>
12. Chen M.S., Li F.N., Chen X.H., Yan X.R., Tuo L. *Brachybacterium halotolerans* sp. nov., a halotolerant, endophytic actinomycete isolated from branch of *Bruquierya gymnoirhiza* // Antonie van Leeuwenhoek. 2021. V. 114. № 6. P. 875–884. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01565-z>
13. Cheptsov V.S., Vorobyova E.A., Manucharova N.A., Gorlenko M.V., Pavlov A.K., Vdovina M.A., Bulat S.A. 100 kGy gamma-affected microbial communities within the ancient Arctic permafrost under simulated Mar-

- tian conditions // *Extremophiles*. 2017. V. 21. № 6. P. 1057–1067.
<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0966-7>
14. *Cheptsov V., Vorobyova E., Belov A., Pavlov A., Tsurkov D., Lomasov V., Bulat S.* Survivability of soil and permafrost microbial communities after irradiation with accelerated electrons under simulated Martian and open space conditions // *Geosciences*. 2018. V. 8. № 8. P. 298.
<https://doi.org/10.3390/geosciences8080298>
 15. *Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Trujillo M.E.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. № 1. P. 461–466.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
 16. *Cox M.M., Battista J.R.* *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3. № 11. P. 882–892.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1264>
 17. *Degré A., van der Ploeg M.J., Caldwell T., Gooren H.P.* Comparison of soil water potential sensors: a drying experiment // *Vadose Zone J.* 2017. V. 16. № 4. P. 1–8.
<https://doi.org/10.2136/vzj2016.08.0067>
 18. *Dieser M., Greenwood M., Foreman C.M.* Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses // *Arct. Antarct. Alp. Res.* 2010. V. 42. № 4. P. 396–405.
<https://doi.org/10.1657/1938-4246-42.4.396>
 19. *Drees K.P., Neilson J.W., Betancourt J.L., Quade J., Henderson D.A., Pryor B.M., Maier R.M.* Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 12. P. 7902–7908.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01305-06>
 20. *El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Y.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I.* Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // *Microbiology*. 2006. V. 75. № 4. P. 380–389.
<https://doi.org/10.1134/S0026261706040035>
 21. *Fontana Jr A.J.* D Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms. // *Water Activity in Foods*. 2020. V. 406. P. 571–572.
<https://doi.org/10.1002/9781118765982>
 22. *Goodfellow M., Nouioui I., Sanderson R., Xie F., Bull A.T.* Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abundant in Atacama Desert soils // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2018. V. 111. № 8. P. 1315–1332.
<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1088-7>
 23. *Grant W.D.* Life at low water activity // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2004. V. 359. № 1448. P. 1249–1267.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1502>
 24. *Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A.* Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. № 3. P. 353–375.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
 25. *Huang W., Ertekin E., Wang T., Cruz L., Dailey M., Di-Ruggiero J., Kisailus D.* Mechanism of water extraction from gypsum rock by desert colonizing microorganisms // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. V. 117. № 20. P. 10681–10687.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2001613117>
 26. *Ishii N., Fuma S., Tagami K., Honma–Takeda S., Shikano S.* Responses of the bacterial community to chronic gamma radiation in a rice paddy ecosystem // *Int. J. Radiat. Biol.* 2011. V. 87. № 7. P. 663–672.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2010.549534>
 27. *Karan R., Capes M.D., DasSarma S.* Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity // *Aquat. Biosyst.* 2012. V. 8. № 1. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-4>
 28. *Köberl M., Müller H., Ramadan E.M., Berg G.* Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 9. P. e24452.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024452>
 29. *Lester E.D., Satomi M., Ponce A.* Microflora of extreme arid Atacama Desert soils // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39. № 2. P. 704–708.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.020>
 30. *Margesin R., Collins T.* Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 6. P. 2537–2549.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09631-3>
 31. *McKnight D.T., Huerlimann R., Bower D.S., Schwarzkopf L., Alford R.A., Zenger K.R.* Methods for normalizing microbiome data: an ecological perspective // *Methods Ecol. Evol.* 2019. V. 10. № 3. P. 389–400.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.13115>
 32. *Mohammadipanah F., Wink J.* Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity // *Front. Microbiol.* 2016. V. 6. P. 1541.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01541>
 33. *Molina-Menor E., Gimeno-Valero H., Pascual J., Peretó J., Porcar M.* High culturable bacterial diversity from a European desert: The Tabernas desert // *Front. Microbiol.* 2021. V. 11. P. 583120.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583120>
 34. *Moyano F.E., Manzoni S., Chenu C.* Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: An exploration of processes and models // *Soil Biol. Biochem.* 2013. V. 59. P. 72–85.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002>
 35. *Musilova M., Wright G., Ward J.M., Dartnell L.R.* Isolation of radiation-resistant bacteria from Mars analog Antarctic Dry Valleys by preselection, and the correlation between radiation and desiccation resistance // *Astrobiology*. 2015. V. 15. № 12. P. 1076–1090.
<https://doi.org/10.1089/ast.2014.1278>
 36. *Nafis A., Raklami A., Bechtaoui N., El Khalloufi F., El Alaoui A., Glick B.R., Hassani L.* Actinobacteria from extreme niches in morocco and their plant growth-promoting potentials // *Diversity*. 2019. V. 11. № 8. P. 139.
<https://doi.org/10.3390/d11080139>
 37. *Narváez–Reinaldo J.J., Barba I., González–López J., Tunnacliffe A., Manzanera M.* Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 15. P. 5254–5262.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00855-10>
 38. *Nithya K., Muthukumar C., Biswas B., Alharbi N.S., Kadaikunnan S., Khaled J.M., Dhanasekaran D.* Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphases on Pyridine-2, 5-diac-

- etamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7 // *Microbiol. Res.* 2018. V. 207. P. 116–133.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.012>
39. Okoro C.K., Brown R., Jones A.L., Andrews B.A., Asenjo J.A., Goodfellow M., Bull A.T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2009. V. 95. № 2. P. 121–133.
<https://doi.org/10.1007/s10482-008-9295-2>
 40. Oren A., Garrity G.M. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 71, part 10 of the *IJSEM* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2022. V. 72. № 1. P. 005165.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001620>
 41. Osman S., Peeters Z., La Duc M.T., Mancinelli R., Ehrenfreund P., Venkateswaran K. Effect of shadowing on survival of bacteria under conditions simulating the Martian atmosphere and UV radiation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. № 4. P. 959–970.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01973-07>
 42. Pascual I., Antolín M.C., García C., Polo A., Sánchez-Díaz M. Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions // *Bioresour. Technol.* 2007. V. 98. № 1. P. 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.026>
 43. Patel S., Jinal H.N., Amaresan N. Isolation and characterization of drought resistance bacteria for plant growth promoting properties and their effect on chilli (*Capsicum annum*) seedling under salt stress // *Bio-catal. Agric. Biotechnol.* 2017. V. 12. P. 85–89.
<https://doi.org/10.1016/j.cbab.2017.09.002>
 44. Ramakrishna W., Rathore P., Kumari R., Yadav R. Brown gold of marginal soil: Plant growth promoting bacteria to overcome plant abiotic stress for agriculture, biofuels and carbon sequestration // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 711. P. 135062.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135062>
 45. Reasoner D.J., Geldreich E.E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 49. № 1. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>
 46. Rebelo Romão I., Rodrigues dos Santos A.S., Velasco L., Martínez-Ferri E., Vilchez J.I., Manzanera M. Seed-Encapsulation of Desiccation-Tolerant Microorganisms for the Protection of Maize from Drought: Phenotyping Effects of a New Dry Bioformulation // *Plants.* 2022. V. 11. № 8. P. 1024.
<https://doi.org/10.3390/plants11081024>
 47. Rietz D.N., Haynes R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity // *Soil Biol. Biochem.* 2003. V. 35. № 6. P. 845–854.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00125-1)
 48. Siebielec S., Siebielec G., Klimkowicz-Pawlas A., Gałązka A., Grządziel J., Stuczynski T. Impact of water stress on microbial community and activity in sandy and loamy soils // *Agronomy.* 2020. V. 10. № 9. P. 1429.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10091429>
 49. Stanaszek–Tomal E. Environmental factors causing the development of microorganisms on the surfaces of national cultural monuments made of mineral building materials // *Coatings.* 2020. V. 10. № 12. P. 1203.
<https://doi.org/10.3390/coatings10121203>
 50. Stevenson A., Burkhardt J., Cockell C.S., Cray J.A., Dijksterhuis J., Fox-Powell M., Hallsworth J.E. Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. № 2. P. 257–277.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12598>
 51. Stevenson A., Hallsworth J.E. Water and temperature relations of soil Actinobacteria // *Environ. Microbiol. Rep.* 2014. V. 6. № 6. P. 744–755.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12199>
 52. Stevenson A., Hamill P.G., O’Kane C.J., Kminek G., Rummel J.D., Voytek M.A., Hallsworth J.E. *Aspergillus penicillioides* differentiation and cell division at 0.585 water activity // *Environ. Microbiol.* 2017. V. 19. № 2. P. 687–697.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13597>
 53. Sun Y., Shi Y.L., Wang H., Zhang T., Yu L.Y., Sun H., Zhang Y.Q. Diversity of bacteria and the characteristics of actinobacteria community structure in Badain Jaran Desert and Tengger Desert of China // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1068.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01068>
 54. Warren–Rhodes K.A., Lee K.C., Archer S.D., Cabrol N., Ng-Boyle L., Wettergreen D., Pointing S.B. Subsurface microbial habitats in an extreme desert Mars-analog environment // *Front. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00069>
 55. Wassmann M., Moeller R., Reitz G., Rettberg P. Adaptation of *Bacillus subtilis* cells to Archean-like UV climate: relevant hints of microbial evolution to remarkably increased radiation resistance // *Astrobiology.* 2010. V. 10. № 6. P. 605–615.
<https://doi.org/10.1089/ast.2009.0455>
 56. Williams J.P., Hallsworth J.E. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. № 12. P. 3292–3308.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02079.x>
 57. Winston P.W., Bates D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research // *Ecology.* 1960. V. 41. № 1. P. 232–237.
<https://doi.org/10.2307/1931961>
 58. Wright P.C., Tanaka T. Physiological modelling of the response of *Kocuria rosea* exposed to changing water activity // *Biotechnol. Lett.* 2002. V. 24. № 8. P. 603–609.
 59. Zenova G.M., Manucharova N.A., Zvyagintsev D.G. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types // *Eurasian Soil Sci.* 2011. V. 44. № 4. P. 417–436.
<https://doi.org/10.1134/S1064229311040132>
 60. Zvyagintsev D.G., Zenova G.M., Sudnitsyn I.I., Gracheva T.A., Lapygina E.V., Napol’skaya K.R., Sydnitsyna A.E. Development of actinomycetes in brown semi-desert soil under low water pressure // *Eurasian Soil Sci.* 2012. V. 45. № 7. P. 717–723.
<https://doi.org/10.1134/S1064229312030155>
 61. Zvyagintsev D.G., Zenova G.M., Sudnitsyn I.I., Gracheva T.A., Napol’skaya K.R., Belousova M.A. Dynamics of spore germination and mycelial growth of streptomycetes under low humidity conditions // *Microbiology.* 2009. V. 78. № 4. P. 440–444.
<https://doi.org/10.1134/S0026261709040079>

Diversity of Bacteria Cultured from Arid Soils and Sedimentary Rocks under Conditions of Available Water Deficiency

V. S. Cheptsov^{1, 2, *}, A. A. Belov¹, and I. V. Sotnikov³

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Space Research Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

³*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: cheptcov.vladimir@gmail.com*

The diversity of bacteria cultured from the soil of the Negev desert (Israel, sample SN2) and the sedimentary rock of the Sahara Desert (Tunisia, sample Alg) has been studied. To assess the ability of bacteria to metabolize at different levels of moisture availability and to reveal bacterial diversity more fully, culturing was carried out on R2A medium with the addition of glycerol to establish a certain level of water activity (A_w) in range from 1.0 to 0.9 (with a step of 0.01 A_w). After incubation, unique morphotypes of cultured bacteria were isolated, described, identified by 16S rRNA sequencing, and tested for the ability to grow in the A_w gradient in pure cultures. After incubation and isolation, 355 strains were identified and tested. Culturable bacteria were found at A_w 0.95 and higher. With a decrease in A_w from 1 to 0.95, the number of cultured bacteria decreased from 10^5 and 10^7 CFU/g in samples SN2 and Alg, respectively, to 2×10^4 CFU/g in both studied samples. As a result of culturing, representatives of 34 genera of bacteria were isolated, mainly representatives of the phylum Actinobacteria; representatives of the genera *Arthrobacter*, *Kocuria*, and *Pseudarthrobacter* dominated. At this, 38 strains with low similarity of nucleotide sequences with databases and, probably, being representatives of previously undescribed species of the genera *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Cellulomonas*, *Conyziocola*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Okibacterium*, *Rathayibacter*, and *Sphingomonas* were revealed. Testing the strains for their ability to grow in pure culture in a gradient of A_w values revealed 18 strains of the genera *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Brachybacterium*, *Serratia*, and *Leucobacter* capable of growing at A_w 0.91. The study confirms the data that desert soils and rocks are a depository of previously undescribed bacterial species and can also be a valuable source of biotechnologically promising strains.

Keywords: water activity, xerotolerance, actinobacteria, novel bacterial species, desert soils

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ
ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ

УДК 631.46,576.8

МИЦЕЛИАЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТ ЭУТРОФНЫХ ТОРФЯНЫХ ПОЧВ
В ЗОНЕ АКТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ДЕТРИТА© 2023 г. А. В. Головченко^{a, *}, Т. А. Грачева^a, Т. А. Семенова^b, А. А. Морозов^{a, b},
С. Р. Самигуллина^a, Т. В. Глухова^c, Л. И. Инишева^d^aМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия^bИнститут проблем эволюции и экологии РАН, Ленинский пр-т, 35, Москва, 117071 Россия^cИнститут лесоведения РАН, ул. Советская, 21, Успенское, Московская область, 143030 Россия^dТомский государственный педагогический университет, ул. Киевская, 60, Томск, 634061 Россия*e-mail: golovchenko.alla@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2022 г.

После доработки 26.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Проведен анализ структурных показателей (обилие, разнообразие) грибных и актиномицетных комплексов эутрофных торфяных почв в зоне основной деструкции органического детрита, представленной подстилкой (слоями L и F) и эутрофно-торфяным горизонтом (TE). Образцы отбирали в заболоченных лесах Тверской и Томской областей (черноольшанник, сосняк, березняк, смешанный лес) в летний период 2021 г. Показатели обилия мицелиальных организмов выявляли люминесцентно-микроскопическим и чашечным методами. Видовую идентификацию культивируемых представителей проводили на основании фенотипических признаков. В подстилках по сравнению с эутрофно-торфяными горизонтами зафиксировано превышение длины грибного мицелия в 2–10 раз, численности культивируемых грибов на 2–3 порядка и актиномицетов на 1–2 порядка. Ферментативный слой подстилки характеризовался максимальным содержанием углерода мицелиального компонента (3–10 мг С/г). Запасы актиномицетной биомассы в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв варьировали от 23 до 60 кг/га, грибной – от 1593 до 3718 кг/га. Доля подстилки в профильном запасе мицелиальной биомассы была более весома в лиственных лесах. Из зоны основной деструкции органического детрита исследуемых почв было выделено 70 видов культивируемых грибов из 43 родов и 42 вида актиномицетов из 12 серий и 4 секций. В грибном комплексе преобладали представители родов *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, в актиномицетном – рода *Streptomyces*. Подстилки не уступали эутрофно-торфяному горизонту по видовому разнообразию грибов и актиномицетов. Видовое сходство комплексов грибов подстилок и горизонта TE – 0,68, комплексов актиномицетов – 0,27.

Ключевые слова: Sapric Histosols, подстилка, грибы, актиномицеты, биомасса, видовое богатство, видовое сходство

DOI: 10.31857/S0032180X22601232, **EDN:** IENPSQ

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших экологических функций, осуществляемой грибами и актиномицетами в почве, является разложение органического детрита. Схожесть экологических стратегий этих организмов в почве обуславливает их мицелиальная организация и формирование спор. Считается, что грибы являются основными аэробными деструкторами органического детрита в торфяниках [10, 32, 35, 36]. Исследования полных профилей низинных торфяников показали, что грибы активно функционируют только в деятельном слое, где были выявлены высокие показатели их обилия, разнообразия и активности. В инертном слое торфяников грибная биомасса была пред-

ставлена спорами грибов, о жизнеспособности которых косвенно свидетельствовало обнаружение в нем культивируемых представителей грибов [11].

Локальное развитие и увеличение численности актиномицетов наблюдается тогда, когда создаются условия для использования сравнительно труднодоступных субстратов [17]. Выявление мицелия по всему профилю мощных низинных торфяников и обнаружение высокой плотности и разнообразия в их деятельном слое говорит о том, что актиномицеты, способные разлагать сложные полимеры, являются неотъемлемым компонентом прокариотного комплекса этих почв [6].

Динамика концентрации органического углерода, формирующего профиль почвы, зависит от процессов его поступления с опадом, перемещения вглубь почвы и микробной трансформации. Особенностью эутрофных торфяных почв (низинных торфяников) является то, что микробная трансформация органического детрита активно происходит в верхних горизонтах этих почв и дальнейшей консервации подвергается уже хорошо разложившийся торф.

Как правило, исследователи этих почв изучают торфяные горизонты в границах деятельного слоя и не анализируют подстилки, хотя они в совокупности с деятельным слоем представляют зону основной деструкции органического детрита в этих почвах. Подстилка занимает особое место среди биогеоценологических горизонтов лесных экосистем, недаром ее выделяют как отдельный компонент. Стратификация подстилки отражает этапы сукцессии, связанные с конвейерной переработкой растительного опада.

Цель исследования — дать количественную и качественную характеристику грибным и актиномицетным комплексам в зоне основной деструкции органического детрита эутрофных торфяных почв. Особое внимание в настоящем исследовании будет уделено подстилкам — малоизучаемым субстратам болотных лесов. Данная работа продолжает цикл статей, отражающих результаты исследования микробных сообществ низинных торфяников России [5–7, 11].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были мощные низинные торфяники различного генезиса, расположенные в Тверской и Томской областях: низинный торфяник ТЛ1 лесного заболачивания под черноольшанником крупнотравно-папоротниковым (56°10'15" N, 32°08'16" E); торфяник ТО озерного заболачивания под сосняком болотно-травяным (56°09'55" N, 32°08'13" E); торфяник ТЛ2 лесного заболачивания под березняком сосново-сфагновым (56°23'25" N, 84°38'47" E); торфяник ТП пойменного заболачивания под смешанным лесом (56°31'09" N, 84°38'27" E). Подробное описание объектов приведено ранее [3, 7].

Исследуемые торфяники отнесены к типу эутрофные торфяные, подтипу перегнойно-торфяные (ТЛ1) и типичные (ТО, ТЛ2, ТП) мощные почвы [18], по WRB — Sapric Histosols [22].

Анализировали подстилку (О) и эутрофно-торфяный горизонт (ТЕ) исследуемых почв. Эти горизонты представляют зону основной деструкции органического детрита в этих почвах. По болотной терминологии эта зона без подстилки соответствует деятельному слою эутрофных торфяников.

Подстилка в исследуемых лесах состоит из двух слоев: L и F. Слой L, мощностью 1–2 см, представляет собой преимущественно прошлогодний опад, слой F (ферментативный слой, мощностью 2–3 см) — измельченные остатки растений, затронутые разложением. Эутрофно-торфяный горизонт в исследуемых почвах представлен низинными торфами: древесным сильноразложившимся (в ТЛ1); древесным и древесно-осоковым среднеразложившимися (в ТО), осоковым и травяным среднеразложившимися (в ТЛ2) и осоковым среднеразложившимся (в ТП). Значения pH_{H_2O} в этом горизонте близки к нейтральным, кроме среднекислых в почве под березняком (ТЛ2). C/N варьирует от 15 до 23 [6].

На каждом из объектов исследования во второй декаде июля 2021 г. методом смешанного образца отбирали подстилки (слоев L и F) и торф (в пределах эутрофно-торфяного горизонта на глубинах 0–20, 20–30 и 30–50 см). Образцы помещали в стерильные пластиковые емкости, которые загружали в сумки-холодильники и доставляли в лабораторию.

Исследование образцов люминесцентно-микроскопическим методом [21] (для получения данных относительно длины и биомассы грибного и актиномицетного мицелия, а также численности и биомассы грибных спор) включало следующие этапы:

1. Приготовление суспензии. 1 г образца (подстилки, торфа) помещали в колбу со 100 мл стерильной воды. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком на диспергаторе Bandelin Sonopuls HD 2070 (Германия) в течение 2 мин.

2. Приготовление препаратов. Для учета актиномицетного мицелия в одном образце готовили 6 препаратов на двух тщательно обезжиренных предметных стеклах. На каждый препарат наносили 0.01 мл обработанной ультразвуком суспензии, которую равномерно распределяли на площади 4 см². Для учета грибов проделывали ту же процедуру, только аликвота на каждый препарат составляла 0.02 мл.

3. Фиксация препаратов. Приготовленные препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре, а затем фиксировали легким нагреванием над пламенем газовой горелки.

4. Окрашивание препаратов. Препараты для учета актиномицетного мицелия окрашивали акридином оранжевым (использовали рабочий раствор красителя в концентрации 1 : 10000). Время экспозиции препаратов в красителе — 3 мин. Промывка в стоячей водопроводной воде — 2 раза по 5 мин. Грибные препараты окрашивали водным раствором калькофлуора белого (использовали рабочий раствор красителя в концентрации 1 : 10000). Время экспозиции препаратов в красителе — 10 мин. Промывка в стоячей водопровод-

ной воде – 30 с. Окрашенные препараты высушивали на воздухе, затем убирали в емкости для хранения.

5. Просмотр препаратов. Готовые препараты для учета актиномицетного мицелия просматривали на микроскопе Люмам-ИЗ (Россия). Использовали светофильтры ЖС-19, ЖС-18, объектив – ($\times 90$ Л), окуляры – ($\times 4$ или $\times 5$). На каждом препарате в 50 полях зрения измеряли с помощью окулярной линейки длину актиномицетного мицелия. Готовые грибные препараты просматривали в 50 полях зрения на микроскопе БиОптик В-300 FL (Россия), объектив – ($\times 100$ Л). Длину грибного мицелия подсчитывали с помощью окулярной линейки. Для каждого фрагмента грибного мицелия и для каждой грибной споры измеряли диаметр, который фиксировали в лабораторном журнале.

Расчет показателей обилия грибов и актиномицетов на основании данных, полученных люминесцентно-микроскопическим методом, проводили по формулам, приведенным в статье [5]. В расчетах микробной биомассы содержание воды и углерода в клетках исследуемых микроорганизмов соответствовало 80 и 50% [23].

Исследование образцов методом посева [21] (для определения численности и таксономического статуса культивируемых актиномицетов и грибов). Численность культивируемых актиномицетов определяли методом поверхностного посева из серии разведений на агаризованную среду Гаузе I [16], культивируемых грибов (микробицетов) – на среду Чапека [16] в пятикратной повторности. Перед посевом актиномицетов образцы предварительно высушивали при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, далее из них готовили суспензии, которые обрабатывали ультразвуком на диспергаторе Vandelin Sonopuls HD 2070 (Германия) в течение 2 мин. Для посевов микробицетов использовали ту же суспензию, что и для приготовления препаратов для люминесцентной микроскопии. Чашки с посевами актиномицетов инкубировали в термостате при 28°C в течение 7–10 сут, с посевами микробицетов – при комнатной температуре в течение 7 сут, затем вели общий подсчет выросших колоний.

Численность культивируемых микроорганизмов ($N_{\text{посев}}$, КОЕ/г субстрата), выявляемых на средах, рассчитывали по формуле

$$N_{\text{посев}} = (anb)/c,$$

где a – среднее количество колоний на чашке; n – разведение, из которого сделан посев; b – количество капель в 1 мл суспензии; c – навеска субстрата, взятая для анализа.

Все показатели обилия актиномицетов и грибов пересчитывали на 1 г сухого субстрата. Для этого определяли влажность образцов подстилки и торфа, высушивая их при 105°C в течение 6 ч.

Определение таксономического статуса актиномицетов начинали с учета их культурально-диагностических признаков, затем оценивали под биноклем при малом увеличении их морфологические признаки [16]. Идентификацию актиномицетов рода *Streptomyces* проводили на ряде диагностических сред (Гаузе I, Гаузе II, овсяном, глицерин-нитратном и пептонно-дрожжевом агаре), рецепты которых представлены в определителе актиномицетов [4].

Таксономическую идентификацию микробицетов проводили на основании фенотипических признаков с помощью классических определителей [27, 28, 30, 31, 34]. Таксономическое положение видов микробицетов сверяли с базами данных: The MycoBank Fungal databases (<http://www.mycobank.org>) и GABI Bioscience Databases Index Fungorum (indexfungorum.org).

Для таксономической единицы (вида) рассчитывали частоту встречаемости (ЧВ) – отношение числа образцов, в которых присутствовал данный вид, к общему числу проанализированных образцов. На основании величины ЧВ выделяли следующие классы обилия: доминирующие (ЧВ > 60%), частые (ЧВ = 30–60%), редкие (ЧВ = 10–30%), случайные (ЧВ < 10%). Для сравнения сходства микробных комплексов горизонтов и почв использовали коэффициент Серенсена [20].

Обработку массивов данных проводили с использованием пакета программ StatSoft Statistica 8.0 и Microsoft Excel 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели обилия актиномицетов и грибов, полученные люминесцентно-микроскопическим методом. В подстилках исследуемых почв длина актиномицетного мицелия варьировала в широком диапазоне – от 0.2 до 2.6 км/г субстрата (табл. 1). В слое L подстилки, представляющей собой преимущественно прошлогодний опад деревьев, диапазон колебаний длины мицелия составил 0.2–0.5 км/г. Значения этого показателя в листовых лесах (черноольшаннике и березняке) были в 2 раза больше, чем в хвойном (сосняке) и смешанном лесах. В ферментативном слое подстилки (F), состоящем из измельченных остатков растений, затронутых разложением, значения длины актиномицетного мицелия в 2–6 раз превосходили таковые в слое L.

В эвтрофно-торфяном горизонте (TE) исследуемых почв длина актиномицетного мицелия колебалась от 0.5 до 3.8 км/г почвы. Среди анализируемых слоев этого горизонта максимально обогащенным мицелием был слой 0–20 см, среди почв – почва пойменного заболачивания под смешанным лесом. В остальных почвах пределы

Таблица 1. Пределы колебаний длины актиномицетного, грибного мицелия (км/г) и численности спор грибов (млн спор/г) в подстилке (О) и эутрофно-торфяном горизонте (ТЕ) исследуемых почв

Горизонт	Торфяник, тип леса			
	ТЛ1, черноольшанник	ТО, сосняк	ТЛ2, березняк	ТП, смешанный
Актиномицетный мицелий				
О1(L)	0.3–0.5	0.2–0.3	0.4–0.5	0.2–0.3
О2(F)	2.0–2.6	0.8–1.3	0.6–1.1	1.0–1.2
ТЕ (0–20 см)	0.9–1.4	0.9–1.1	0.5–0.7	2.7–3.8
ТЕ (20–30 см)	0.5–0.8	0.7–1.2	0.5–0.7	1.3–1.6
ТЕ (30–50 см)	0.5–0.8	0.6–0.8	0.6–1.3	0.9–1.3
Грибной мицелий				
О1(L)	0.7–0.9	0.5–0.6	1.5–1.4	0.6–0.8
О2(F)	3.2–3.5	2.8–3.2	3.2–3.7	3.0–3.2
ТЕ (0–20 см)	0.6–0.8	1.5–1.8	0.3–0.4	0.9–1.1
ТЕ (20–30 см)	0.2–0.3	1.2–1.4	0.3–0.4	0.2–0.4
ТЕ (30–50 см)	0.2–0.3	0.6–0.8	0.3–0.4	0.2–0.4
Численность спор грибов				
О1(L)	16–19	13–14	27–30	15–17
О2(F)	30–36	35–40	30–35	68–81
ТЕ (0–50 см)	14–30	13–24	11–27	15–36

колебаний длины актиномицетного мицелия в ТЕ были схожими – от 0.5 до 1.4 км/г.

Рассматривая целиком зону основной деструкции органического детрита исследуемых почв, можно выделить в ней горизонты с максимальным обилием актиномицетного мицелия. Для почв лесного (ТЛ1) и озерного (ТО) заболачивания – это ферментативный слой подстилки, для почвы пойменного (ТП) заболачивания – верхняя часть горизонта ТЕ. В почве лесного заболачивания под березняком (ТЛ2) такой горизонт выделить проблематично, так как в пределах зоны основной деструкции детрита длина актиномицетного мицелия флуктуировала слабо (рис. 1а).

Длина грибного мицелия в слое L подстилок исследуемых торфяников варьировала от 0.5 до 1.5 км/г субстрата, в слое F – от 2.8 до 3.2 км/г, в горизонте ТЕ – от 0.2 до 1.8 км/г. Численность спор грибов в подстилках находилась в диапазоне 13–81 млн спор/г, в ТЕ – 11–36 млн спор/г.

В зоне основной деструкции органического детрита ферментативный слой подстилки оказался горизонтом с максимальной концентрацией грибов. В нем длина грибного мицелия была в 2–6 раз больше, чем в опаде (слой L подстилки) и в 2–10 раз больше, чем в слое ТЕ, а численность спор грибов характеризовалась наибольшими абсолютными значениями.

При переходе от слоя подстилки F к эутрофно-торфяному горизонту (ТЕ) содержание грибного

мицелия убывало: плавно в почве под сосняком и резко – в почвах под лиственными породами и смешанным лесом (рис. 1б). В вертикальном градиенте горизонта ТЕ происходило дальнейшее уменьшение длины грибного мицелия, и в слое 30–50 см большинства торфяников она составляла 0.2–0.4 км/г.

Исследование микробных комплексов лесных почв (бело-подзолистой и бурозема) Центрального лесного государственного биосферного заповедника (Тверская область) люминесцентно-микроскопическим методом также показало, что численность всех групп микроорганизмов (бактерий, мицелия актиномицетов, спор и мицелия грибов) максимальна в подстилках и затем резко убывает по профилю [23]. Длина грибного мицелия в подстилках этих почв варьировала от 0.6 до 3 км/г, длина актиномицетного мицелия измерялась сотнями метров, численность спор грибов составляла десятки – сотни миллионов на 1 г субстрата. Среди исследуемых слоев подстилки (L, F, H) максимальными показателями обилия микроорганизмов характеризовался слой F [9]. Эти данные, полученные для лесных почв, согласуются с установленными в этом исследовании.

Биомасса актиномицетного мицелия в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв варьировала от 9 до 136 мкг/г, биомасса грибного мицелия – от 746 до 19208 мкг/г, биомасса спор грибов – от 108 до 603 мкг/г. Фер-

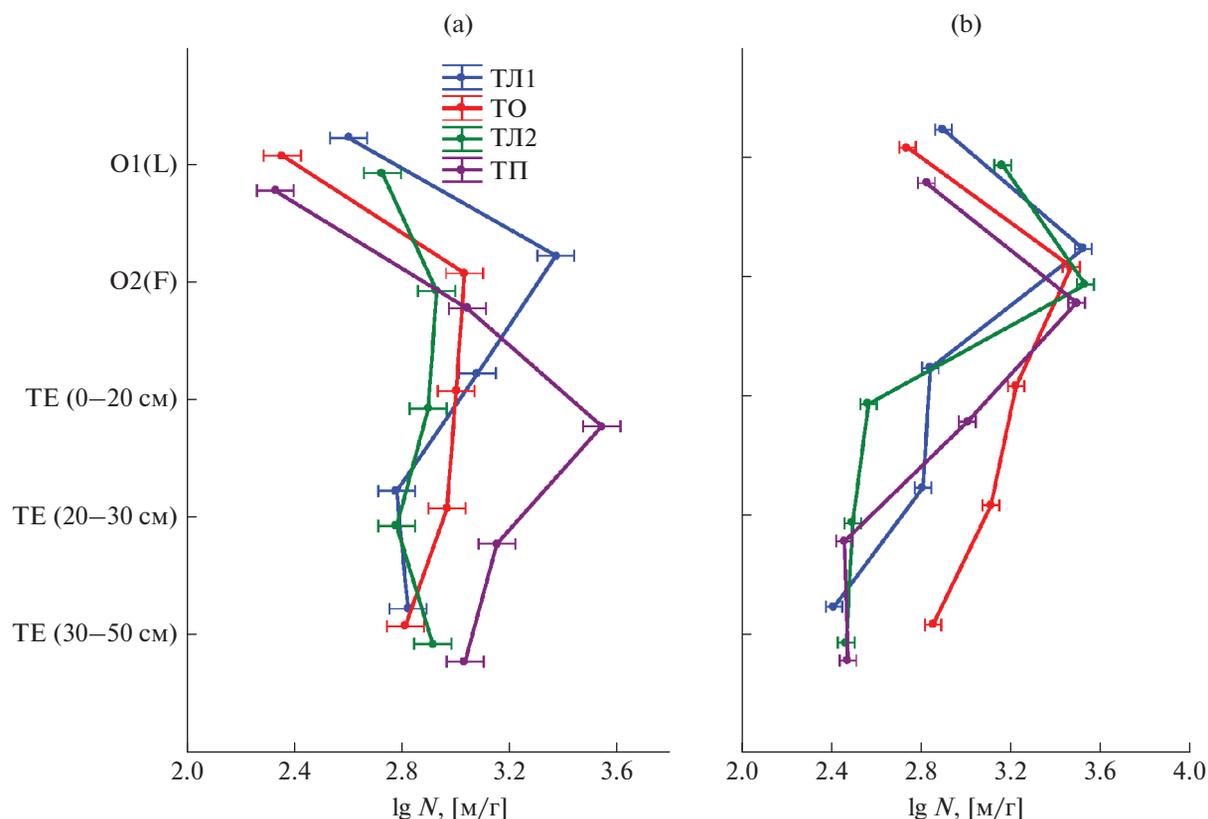


Рис. 1. Распределение актиномицетного (а) и грибного (б) мицелия в зоне основной деструкции органического детрита эвтрофных торфяных почв.

ментативный слой подстилок характеризовался максимальными значениями как актиномицетной, так и грибной биомассы, тогда как верхняя часть эвтрофно-торфяного горизонта — только актиномицетной (табл. 2).

Запасы актиномицетной биомассы в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв варьировали от 23 до 60 кг/га. Вклад подстилки в профильный запас актиномицетной биомассы составлял 4–17%, вклад эвтрофно-торфяного горизонта — 83–96% (рис. 2а).

Запасы грибной биомассы в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв находились в диапазоне 1593–3718 кг/га, т.е. были на 2 порядка больше, чем запасы актиномицетной биомассы. Вклад подстилки в профильный запас грибной биомассы колебался от 8 до 67%, вклад эвтрофно-торфяного горизонта соответственно — от 33 до 92% (рис. 2б).

Следует отметить, что вклад подстилки в профильный запас биомассы (как грибной, так и ак-

Таблица 2. Экстремальные значения биомассы актиномицетного (АМ), грибного (ГМ) мицелия, спор грибов (СГ) и углерода микробной биомассы мицелиального компонента (АМ + ГМ) в подстилке (О) и эвтрофно-торфяном горизонте (ТЕ) исследуемых почв

Горизонт	Биомасса, мкг/г сухого субстрата			Углерод биомассы, мг С/г сухого субстрата
	АМ	ГМ	СГ	АМ + ГМ
O1(L)	9–21	1424–4095	108–330	0.7–2.1
O2(F)	34–92	6669–19208	230–603	3.3–9.6
TE (0–20 см)	32–136	862–4276	158–374	0.4–2.2
TE (20–30 см)	24–56	658–7296	135–242	0.3–3.7
TE (30–50 см)	26–43	746–4043	210–387	0.4–2.0

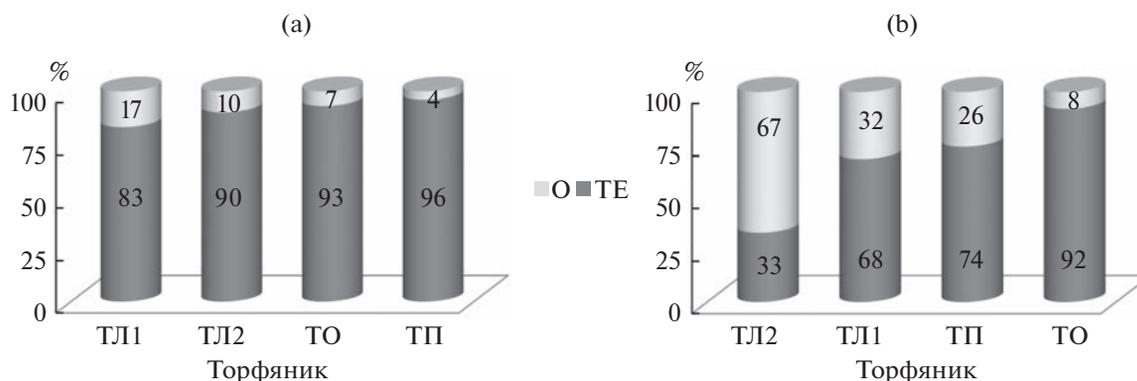


Рис. 2. Доли подстилки (O) и эутрофно-торфяного горизонта (TE) в профильном запасе (0.55 м) актиномицетной (а) и грибной (б) биомассы.

тиномицетной) был больше в почвах под листовыми лесами (ТЛ1 и ТЛ2).

В горизонтах исследуемых почв углерод биомассы мицелиального компонента варьировал от 0.3 до 9.6 мг С/г. Максимальные значения этого показателя обилия были выявлены в ферментативном слое подстилок. Они превосходили в 4–10 раз таковые для слоя L и горизонта TE. В верхних слоях (0–5 и 5–10 см) серой лесной, темно-каштановой и каштановой почв под листовыми лесами содержание углерода мицелиального компонента находилось в диапазоне 0.7–4.7 мг С/г почвы [1]. В такой же диапазон попадали значения, выявленные для слоя L подстилки исследуемых почв, а для слоя F они были в 2–5 раз больше.

Запасы углерода микробной биомассы (грибной и актиномицетной) в подстилках исследуемых лесов в учитываемый период года варьировали от 140 до 535 кг С/га, общее содержание углерода – от 25 329 до 47 237 кг С/га; в горизонте TE эти значения составили (273–1731 кг С/га) и (312 144–422 913 кг С/га) соответственно. На основании этих данных были рассчитаны доли углерода микробной биомассы в общем содержании углерода органического вещества исследуемых горизонтов. В подстилках доля углерода учитываемой микробной биомассы в летний сезон составила 0.6–1.5%, в эутрофно-торфяном горизонте – 0.1–0.5%. Максимальных значений она достигала в подстилке под березняком (1.5%). Для сравнения в почвах верхового болота доля углерода микробной биомассы в общем содержании углерода органического вещества колебалась от 0.2 до 3% [10]; в подстилках запovedных ельников – от 5.5 до 17.2%, в минеральных горизонтах почв (бело-подзолистой и бурозема) под этими же ельниками – от 48 до 68% [23].

Показатели обилия актиномицетов и грибов, полученные методом посева. В зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв численность культивируемых актиномице-

тов варьировала в широком диапазоне – от 10^4 до 10^7 КОЕ/г. Наибольшие значения выявляли в подстилках исследуемых почв. Максимально обогащенными актиномицетами оказались слой L подстилки в листовых лесах и ферментативный слой подстилки в смешанном лесу (табл. 3). Содержание мицелиальных прокариот в подстилках исследуемых болотных лесов сопоставимо с таковым для лесов европейской части России [9, 13, 15, 24] и северо-востока Китая [25]. Вероятно, близкие значения показателей обилия актинобиоты в подстилках, территориально удаленных лесных биогеоценозов, обусловлены сходством растительных полимеров (целлюлоза, крахмал, лигнин, хитин), составляющих основу питания мицелиальных прокариот.

Если рассматривать распределение культивируемых актиномицетов в вертикальном градиенте зоны основной деструкции органического детрита исследуемых почв, то можно отметить, что оно не совпадает с выявленным ранее люминесцентно-микроскопическим методом. Так, в почвах под листовыми лесами содержание актиномицетов было максимальным в слое L подстилки, далее оно уменьшалось на порядок – в слое F подстилки и еще на порядок – в эутрофно-торфяном горизонте. Следует отметить, что численность актиномицетов на разных глубинах горизонта TE не менялась и поддерживалась на уровне 10^4 КОЕ/г. В почве под хвойным лесом численность актиномицетов в зоне основной деструкции органического детрита флуктуировала в интервале $(40–160) \times 10^3$ КОЕ/г и не имела ярко выраженных максимумов и минимумов. Почва под смешанным лесом, напротив имела горизонт с выраженным максимумом – это ферментативный слой подстилки. В нем содержание актиномицетов было на порядок больше, чем в слое L и на 1–2 порядка больше, чем в горизонте TE (табл. 3).

Многолетнее изучение актиномицетных комплексов в разных типах лесных биогеоценозов

Таблица 3. Пределы колебаний численности культивируемых актиномицетов и грибов в подстилке (О) и эутрофно-торфяном горизонте (ТЕ) исследуемых почв

Торфяник, тип леса	Горизонт	Численность, 10 ³ КОЕ/г	
		актиномицетов	грибов
ТЛ1, черноольшанник	O1(L)	2800–6160	2778–2944
	O2(F)	540–740	10526–12263
	ТЕ (0–20 см)	20–80	39–72
	ТЕ (20–30 см)	20–60	35–135
	ТЕ (30–50 см)	20–80	75–150
ТО, сосняк	O1(L)	40–80	1266–1656
	O2(F)	120–160	1500–4700
	ТЕ (0–20 см)	80–140	74–184
	ТЕ (20–30 см)	120–140	33–56
	ТЕ (30–50 см)	40–80	40–80
ТЛ2, березняк	O1(L)	6880–11 120	1795–2564
	O2(F)	320–560	1739–3478
	ТЕ (0–20 см)	20–80	29–52
	ТЕ (20–30 см)	20–40	47–65
	ТЕ (30–50 см)	20–30	8–23
ТП, смешанный лес	O1(L)	500–680	1111–4627
	O2(F)	3080–4600	4117–11 765
	ТЕ (0–20 см)	100–120	133–267
	ТЕ (20–30 см)	140–220	15–46
	ТЕ (30–50 см)	20–40	10–30

Центрального лесного государственного биосферного заповедника показало, что наибольшее количество актиномицетов находится в ферментативном слое лесных подстилок, выявлено плавное уменьшение их численности с глубиной [14].

В зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв численность микромицетов варьировала в широком диапазоне от 10³ до 10⁷ КОЕ/г. В подстилках исследуемых почв она была на 2–3 порядка выше, чем в эутрофно-торфяном горизонте. Закономерности распределения грибов в зоне основной деструкции органического детрита, установленные люминесцентно-микроскопическим методом, подтверждены методом посева. Оба метода фиксировали численное преимущество грибов в ферментативном слое подстилок исследуемых почв.

Анализ подстилок и гумусово-аккумулятивных горизонтов широкого спектра лесных почв (торфяно-глебовая, бело-подзолистая, дерново-палево-подзолистая, бурозем, торфяная низинная) выявил, что численность микромицетов в них составляла в большинстве случаев сотни тысяч КОЕ/г и была на порядок ниже в иллювиальных горизонтах и подстилающей породе [8]. Чис-

ленность микромицетов, установленная в подстилках исследуемых лесов, характеризуется большими показателями, что может быть связано как с особенностями местообитания, так и с пересчетом численности на сухой субстрат.

Таксономическая структура выделенных комплексов актиномицетов и микромицетов. Из зоны основной деструкции органического детрита исследуемых почв было выделено 89 штаммов актиномицетов, подавляющее большинство из них (70) были идентифицированы до рода *Streptomyces*, 3 — до рода *Micromonospora*. Доминирование в образцах подстилки и эутрофно-торфяного горизонта представителей рода *Streptomyces* не случайно, так как они являются наиболее многочисленной группой почвенных мицелиальных прокариот [26, 38].

Стрептомицеты были отнесены к 42 видам из 12 серий и 4 секций (табл. 4). Из торфяных почв ТЛ1 и ТО было выделено по 13 видов, из ТП — 12 видов, из ТЛ2 — 10 видов рода *Streptomyces*. Видовое сходство комплексов стрептомицетов исследуемых почв оказалось низким (коэффициент Серенсена (K_s) не превышал 0.17). Общими в индивидуальных почвенных списках были только 1–2 вида.

Таблица 4. Видовой состав стрептомицетов в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв

Секция	Серия	Вид
Cinereus	Achromogenes	<i>S. aburaviensis</i> <i>S. albogriseolus</i> <i>S. bikiniensis</i> <i>S. recifensis</i> <i>S. tanashiensis</i>
	Aureus	<i>S. griseoluteus</i> <i>S. zaomyceticus</i>
	Chrysomallus	<i>S. astrolivaceus</i> <i>S. malachitorectus</i> <i>S. viridobrunneus</i> <i>S. viridogenes</i>
	Chromogenes	<i>S. albaduncus</i> <i>S. globosus</i> <i>S. globisporus</i> <i>S. canofumeus</i> <i>S. xanthocidius</i> <i>S. polychromogenes</i> <i>S. purpeofuscus</i> <i>S. nashvillensis</i> <i>S. erythermus</i>
	Violaceus	<i>S. litmocidini</i> <i>S. prunicolor</i> <i>S. ramulosus</i> <i>S. tubercidicus</i> <i>S. violaceoruber</i>
Roseus	Lavenduale-roseus	<i>S. cattleya</i> <i>S. filamentosus</i> <i>S. roseus</i>
	Fradiae	<i>S. luridus</i>
	Fuscus	<i>S. phaeochromogenes</i>
	Ruber	<i>S. longispororuber</i>
Helvolo-Flavus	Helvolus	<i>S. xantochromogenes</i>
Albus	Albus	<i>S. albolongus</i> <i>S. alborubidus</i> <i>S. candidus</i> <i>S. longisporus</i> <i>S. sindenensis</i> <i>S. varsoviensis</i>
	Albocoloratus	<i>S. brunneofungus</i> <i>S. alboflavus</i> <i>S. baarensis</i> <i>S. griseloalbus</i>

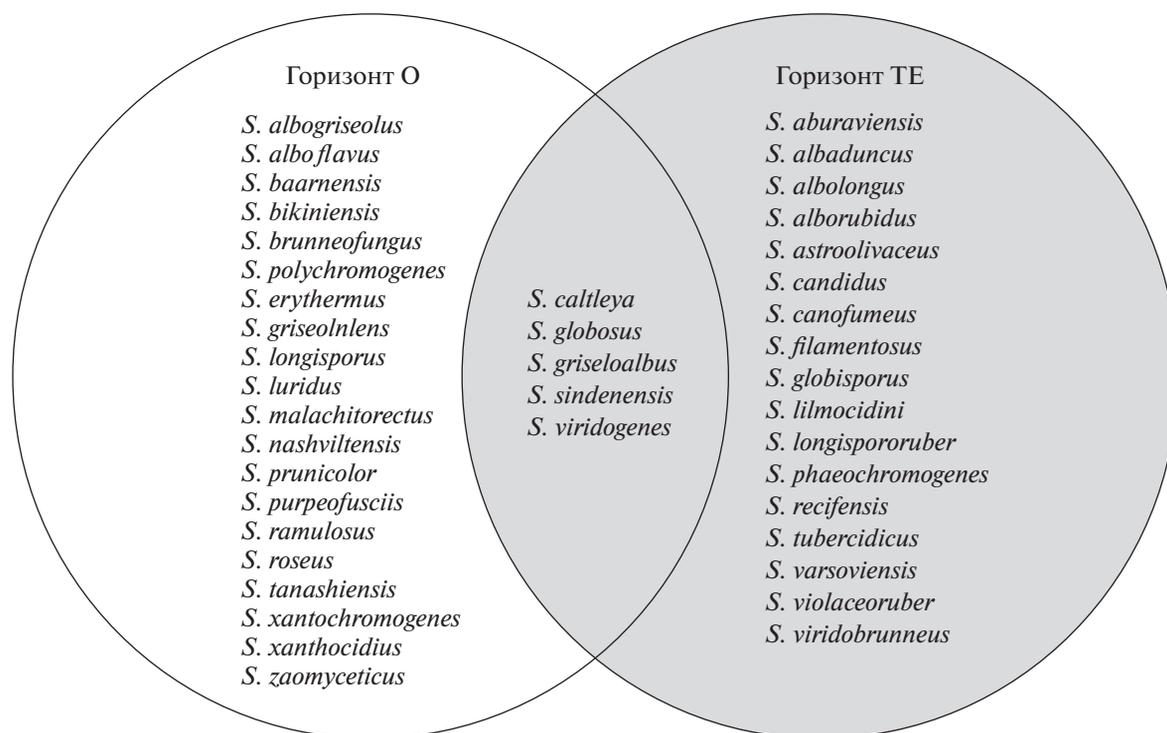


Рис. 3. Видовой состав стрептомицетов в подстилке (О) и эутрофно-торфяном горизонте (ТЕ) исследуемых почв.

Проанализированы списки видов стрептомицетов, выделенных из подстилок и эутрофно-торфяного горизонта исследуемых почв. В подстилках спектр включал 26 видов, в горизонте ТЕ — 23 вида. K_s для этих горизонтов составил 0.27. Подавляющее большинство видов, типичных для подстилок, не было отмечено в эутрофно-торфяном горизонте. Общими оказались только 5 видов: *S. caltleya*, *S. globosus*, *S. griseolalbus*, *S. sindenensis*, *S. viridogenes* (рис. 3). В подстилках наиболее часто встречались виды *S. griseolalbus* (ЧВ — 50%) и *S. zaomyceticus* (ЧВ — 38%). Большинство видов попадало в группу редких и случайных (ЧВ < 30%). Аналогичную картину наблюдали в горизонте ТЕ, в котором ЧВ выявляемых видов не превышала 25%.

Виды стрептомицетов *S. griseolalbus* и *S. zaomyceticus* были впервые выделены из почв, они являются продуцентами антибиотиков гризеина и заомицина. Природные изоляты *Streptomyces zaomyceticus* обладают широким спектром антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе и *Staphylococcus aureus*, который чрезвычайно устойчив к бета-лактамам и другим классам антибиотиков [33]. Природные изоляты *Streptomyces griseolalbus* являются фитопатогенами, которые продуцируют ферменты, разрушающие клеточную стенку. Их используют для борьбы с болезнью увядания огурцов, вызванной оомицетами *Pythium aphanidermatum* [29]. Следует отметить, что виды стрепто-

мицетов *S. griseolalbus* и *S. zaomyceticus* выделены из подстилок болотных лесов впервые.

Анализ таксономической структуры микромицетных комплексов показал, что зона основной деструкции органического детрита исследуемых почв характеризуется высоким видовым разнообразием. Выделено 70 видов культивируемых грибов из 43 родов, включая две формы стерильного мицелия (табл. 5). Большинство родов микромицетов (35) из отдела Ascomycota. Отдел Mucoromycota был представлен 7 родами: *Absidia*, *Cunninghamella*, *Linnemannia*, *Mucor*, *Mortierella*, *Syncephalastrum*, *Umbelopsis*. Отдел Basidiomycota — одним родом. По числу видов преобладали род *Penicillium* (10 видов) с родом *Talaromyces* (5 видов), а также род *Trichoderma* (9 видов). Остальные рода представлены одним, редко двумя видами. Таксономическая структура микромицетных комплексов эутрофно-торфяных почв согласуется с данными, приведенными в обзорных и научно-практических статьях исследователей, изучавших микобиоту болотных и лесных экосистем бореальной зоны [8, 35, 37].

Видовое богатство в почвах под лиственными лесами (ТЛ1 и ТЛ2) составило 26 и 34 соответственно, в почве под смешанным лесом (ТП) — 27, в почве под хвойным лесом (ТО) — 38. Количество общих видов микромицетов, обнаруженных в почвах под различными лесами, варьировало от 8 до 16. Видовое сходство микромицетных ком-

Таблица 5. Видовой состав микромицетов и частота их встречаемости в подстилке (О) и эутрофно-торфяном горизонте (ТЕ) исследуемых почв

Вид микромицетов/Горизонт	Частота встречаемости, %	
	О	ТЕ
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	3	—
<i>Acremonium</i> sp. 1	3	—
<i>Acremonium</i> sp. 2	5	2
<i>Akanthomyces lecanii</i> (Zimm.) Spatafora, Kepler & Shrestha	30	10
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	3	—
<i>Ascochyta medicaginicola</i> Qian Chen	—	2
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud	5	2
<i>Beauveria</i> sp.	—	2
<i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. & Melin	—	15
<i>Cephalotrichum stemonitis</i> (Pers.) Nees	—	2
<i>Cladosporium cladosporoides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	5	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz	3	—
<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	—	5
<i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora	13	23
<i>Cosmospora butyri</i> (J.F.H. Beyma) Gräfenhan, Seifert & Schroers	3	5
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee	3	2
<i>Cylindrocarpon didymum</i> (Hartig) Wollenw.	8	5
<i>Cylindrocladium</i> sp.	—	2
<i>Exophiala jeanselmei</i> (Langeron) McGinnis & A.A. Padhye	—	8
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.	3	5
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	15	—
<i>Fusarium</i> sp.	5	—
<i>Keithomyces carneus</i> (Duché & Heim) Samson, Luangsa-ard & Houbraken	8	15
<i>Lecanicillium fungicola</i> (Preuss) Zare & W. Gams	—	2
<i>Linnemannia hyalina</i> (Harz) Vandepol & Bonito	3	25
<i>Microascus brevicaulis</i> S.P. Abbot	3	2
<i>Mortirella</i> sp.	15	2
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	3	—
<i>Paraphoma fimeti</i> (Brunaud) Gruyter, Aveskamp & Verkley	3	—
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	73	38
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	5	20
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling	3	2
<i>Penicillium glaucoalbidum</i> (Desm.) Houbraken & Samson	—	2
<i>Penicillium janczewskii</i> K.W. Zaleski	25	22
<i>Penicillium montanense</i> M. Chr. & Backus	—	2
<i>Penicillium solitum</i> Westling	25	7
<i>Penicillium thomii</i> Maire	40	17
<i>Penicillium</i> sp. 1	—	3
<i>Penicillium</i> sp. 2	23	—
<i>Phialophora cyclaminis</i> J.F.H. Beyma	—	3
<i>Phoma</i> sp.	13	5
<i>Podila verticillata</i> (Linnem.) Vandepol & Bonito	13	7
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D.L. Lindner	5	22

Таблица 5. Окончание

Вид микромицетов/Горизонт	Частота встречаемости, %	
	О	ТЕ
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Houbraken et al.	10	—
<i>Rinocladium</i> sp.	3	—
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.	35	5
<i>Syncephalastrum</i> sp.	3	—
<i>Talaromyces diversus</i> (Raper & Fennell) Samson, Yilmaz & Frisvad	8	7
<i>Talaromyces duclauxii</i> (Delacr.) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert	—	2
<i>Talaromyces pinophilus</i> (Hedgc.) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert	18	6
<i>Talaromyces purpureogenus</i> (Stoll) Samson, Yilmaz et al.	5	3
<i>Talaromyces stipitatus</i> (Thom ex Emmons) Benj.	3	2
<i>Talaromyces verruculosus</i> (Peyronel) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert	10	3
<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst.	8	3
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	—	7
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	13	15
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	8	—
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai	13	2
<i>Trichoderma virens</i> (Mill., Giddens & Foster) Arx	3	3
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	13	7
<i>Trichoderma</i> sp. 1	10	3
<i>Trichoderma</i> sp. 2	23	15
<i>Umbelopsis ramanniana</i> (Möller) W. Gams	3	7
<i>Umbelopsis vinacea</i> (Dixon-Stew.) Arx	—	2
Базидиальный мицелий	10	—
Стерильный мицелий белый	5	—
Стерильный мицелий темный	—	3
Неидентифицированный мицелий 1	5	—
Неидентифицированный мицелий 2	3	—
Неидентифицированный мицелий 3	—	2

Примечание. Прочерк — вид не выделен. Цветом выделены виды, встречающиеся, как в горизонте О, так и в горизонте ТЕ.

плексов (K_s) в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв было невысоким — от 0.31 до 0.50. Наибольшее сходство отмечено между почвами под сосняком (ТО) и березняком (ТЛ2).

Видовые списки микромицетов, выделенных из подстилок и эутрофно-торфяного горизонта исследуемых почв, насчитывали по 53 представителя, из которых 36 видов были общими. Большое количество общих видов обусловило высокую степень сходства микробиоты подстилок и горизонта ТЕ, K_s составил 0.68.

Представители доминирующих родов (*Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*) встречались как в подстилках, так и в горизонте ТЕ. Отличия проявлялись на уровне видов, как их спектров, так и

частоты встречаемости (табл. 5). Доминирование этих грибов характерно для различных почв бореальной зоны, в том числе болотных. Это типичные почвенные сапротрофы, способные развиваться при низкой доступности питательных веществ и усваивать труднорастворимые полимерные растительные субстраты [19].

В подстилках доминирующим видом был *Penicillium aurantiogriseum*, частота встречаемости которого составляет 73%. Часто встречались виды *Penicillium thomii*, *Sarocladium strictum* и *Akanthomyces lecanii*. Однако подавляющее большинство видов, изолированных как из подстилки, так и из горизонта ТЕ, были отнесены по ЧВ к редким и случайным (табл. 5). Более высокое видовое разнообразие микромицетов в горизонте ТЕ было

сопряжено с более низкими показателями доминирования.

Сравнение слоев подстилки (L и F) между собой выявило большее видовое разнообразие микромицетов в ферментативном слое. В каждой почве оно достигалось за счет представителей разных родов. Так, в слое F подстилки соснового леса активно развивались быстрорастущие грибы из родов *Cylindrocarpon*, *Mortierella*, *Mucor*, а в слое F подстилки черноольшанника – рода *Trichoderma*.

В подстилках, в отличие от эутрофно-торфяного горизонта, обильно развивались мукоровые грибы (*Absidia cylindrospora*, *Mucor hiemalis*, *Syncephalastrum* sp.), а также факультативные фитопатогенные грибы (*Alternaria alternata*, *Paraphoma fimetii*, *Fusarium poae*, *F. oxisporum*). Мукоровые грибы являются сапротрофами-сахаролитиками. Они используют легкодоступные сахара и повсеместно встречаются в слабоборазложившихся органических субстратах, каковыми являются подстилки. Они стоят в начале сукцессионной цепочки микроорганизмов-деструкторов растительного опада [2, 12]. Факультативные фитопатогенные грибы обитают на растениях как эпифиты или фитопатогены, а при попадании в почву с опадом переходят на сапротрофный тип питания, участвуя в деструкции растительного детрита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование актиномицетных и грибных комплексов в зоне основной деструкции органического детрита эутрофных торфяных почв, представленной подстилкой (со слоями L и F) и эутрофно-торфяным горизонтом (TE).

Установлено, что подстилки в болотно-лесных экосистемах являются субстратами, которые активно колонизируют грибы и актиномицеты, о чем свидетельствуют их высокие показатели обилия, установленные как прямым микроскопическим, так и чашечным методами.

Показано, что среди слоев подстилки ее ферментативный слой (F) был максимально обогащен мицелием, как грибным, так и актиномицетным (его содержание было в 2–6 раз больше, чем в слое L). Аналогичная тенденция выявлена для численности культивируемых грибов. Численность актиномицетов зависела от типа подстилки: в лиственных лесах она была больше в слое L, тогда как в смешанном и хвойном лесе – в слое F.

Выявлено, что в подстилках больше, чем в эутрофно-торфяных горизонтах, длина грибного мицелия (в 2–10 раз), численность микромицетов (на 2–3 порядка) и актиномицетов (на 1–2 порядка).

В зоне основной деструкции органического детрита эутрофных торфяных почв ферментатив-

ный слой подстилки характеризовался максимальным содержанием углерода мицелиального компонента (3–10 мг С/г сухого субстрата). Запасы актиномицетной биомассы в зоне основной деструкции органического детрита исследуемых почв варьировали от 23 до 60 кг/га, грибной – от 1593 до 3718 кг/га. Доля подстилки в профильном запасе как актиномицетной, так и грибной биомассы была более весома в лиственных лесах. Доля углерода учитываемой микробной биомассы в общем содержании углерода органического вещества исследуемых горизонтов не превышала 1.5% в подстилках и 0.5% – в эутрофно-торфяных горизонтах.

Актиномицеты, выделенные из зоны основной деструкции органического детрита исследуемых почв, принадлежали к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*. Представители доминирующего рода *Streptomyces* были отнесены к 42 видам из 12 серий и 4 секций. Видовое сходство актиномицетных комплексов рассматриваемых горизонтов и почв оказалось низким (K_s не превышал 0.27), что свидетельствует об их специфичности, а также уникальности болотных биоценозов, из которых они выделены.

Из зоны основной деструкции органического детрита исследуемых почв выделено 70 видов культивируемых грибов из 43 родов. Большая часть изолятов принадлежала отделу Ascomycota. Преобладали представители родов *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*. Микобиота была представлена преимущественно редкими и случайными видами. Доминирующим видом в подстилках был *Penicillium aurantiogriseum*, часто встречающимися видами – *Penicillium thomii*, *Sarocladium strictum* и *Akanthomyces lecanii*. Видовое сходство микромицетных комплексов почв было средним (K_s варьировал от 0.31 до 0.50), а горизонтов – высоким (K_s составил 0.68). Сравнение слоев подстилки (L и F) между собой выявило большее видовое разнообразие микобиоты в ферментативном слое, которое достигалось в каждой почве за счет представителей разных родов.

Подстилки не уступают эутрофно-торфяному горизонту (по болотной терминологии соответствующему деятельному слою эутрофных торфяников) по видовому разнообразию и превосходят по обилию мицелиальных прокариот и эукариот, что делает их значимым компонентом болотно-лесных экосистем эутрофного типа. В подстилках этих экосистем активно идут процессы деструкции органического детрита, так как следующий за подстилками эутрофно-торфяный горизонт представлен низинными торфами со средней и высокой степенью разложения. Таким образом, подстилки болотных лесов являются перспективными природными локусами для выделения активных штаммов грибов и актиноми-

цетов, обладающих способностью деполимеризовать и минерализовать целлюлозу, лигнин и другие органические субстраты. В дальнейшем будет оценен функциональный и антагонистический потенциал коллекционных штаммов грибов и актиномицетов, выделенных из подстилок болотных лесов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № 075-15-2021-1396.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ананьева Н.Д., Полянская Л.М., Сусьян Е.А., Васенкина И.В., Вирт С., Звягинцев Д.Г.* Сравнительная оценка микробной биомассы почв, определяемой методами прямого микроскопирования и субстрат-индуцированного дыхания // *Микробиология*. Т. 77. № 3. С. 404–412.
2. *Берсенева О.А., Саловарова В.П., Приставка А.А.* Почвенные микромицеты основных природных зон // *Известия Иркутского гос. ун-та. Сер. Биология. Экология*. 2008. Т. 1. № 1. С. 1–9.
3. *Вомперский С.Э., Сирин А.А., Глухов А.И.* Формирование и режим стока при гидролесомелиорации. М.: Наука, 1988. 168 с.
4. *Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С.* Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 247 с.
5. *Головченко А.В., Волкова Е.М.* Запасы и структура микробной биомассы в торфяниках карстовых ландшафтов Тульской области // *Почвоведение*. 2019. № 3. С. 370–376.
6. *Головченко А.В., Грачева Т.А., Лыпкань В.А., Добровольская Т.Г., Манучарова Н.А.* Актиномицетные комплексы низинных торфяников // *Почвоведение*. 2022. № 8. С. 990–999.
7. *Головченко А.В., Дмитриенко Ю.Д., Морозов А.А., Поздняков Л.А., Глухова Т.В., Инишева Л.И.* Микробная биомасса в низинных торфяниках: запасы, структура, активность // *Почвоведение*. 2021. № 7. С. 838–848.
8. *Головченко А.В., Добровольская Т.Г., Максимова И.А., Терехова В.А., Звягинцев Д.Г., Трофимов С.Я.* Структура и функции микробных сообществ почв южной тайги // *Микробиология*. 2000. Т. 69. № 4. С. 1–12.
9. *Головченко А.В., Добровольская Т.Г., Полянская Л.М.* Численность и структура микробных комплексов в контрастных почвах мезоморфного ряда ельников южной тайги // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение*. 1995. № 3. С. 57–63.
10. *Головченко А.В., Кураков А.В., Семенова Т.А., Звягинцев Д.Г.* Обилие, разнообразие, жизнеспособность и факторная экология грибов в торфяниках // *Почвоведение*. 2013. № 1. С. 80–97.
11. *Головченко А.В., Семенова Т.А., Морозов А.А., Глухова Т.В., Инишева Л.И.* Микобиота низинных торфяников // *Почвоведение*. 2022. № 3. С. 337–346.
12. *Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г., Чернов И.Ю., Головченко А.В., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Манучарова Н.А., Марфенина О.Е., Полянская Л.М., Степанов А.Л., Умаров М.М.* Роль микроорганизмов в экологических функциях почв // *Почвоведение*. 2015. № 9. С. 1087–1096.
13. *Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М.* Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 257 с.
14. *Зенова Г.М., Грачева Т.А., Манучарова Н.А., Звягинцев Д.Г.* Актиномицетные сообщества лесных экосистем // *Почвоведение*. 1996. № 2. С. 1347–1351.
15. *Зенова Г.М., Грядунова А.А., Дорошенко Е.А., Лихачева А.А., Початкова Т.Н., Судницын И.И., Звягинцев Д.Г.* Влияние влажности на жизнедеятельность актиномицетов в низинной торфяной почве // *Почвоведение*. 2007. № 5. С. 616–621.
16. *Зенова Г.М., Кураков А.В.* Методы определения структуры комплексов почвенных актиномицетов и грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 54 с.
17. *Зименко Т.Г., Самсонова А.С., Мисник А.Г., Гаврилкина В.В., Филиппианова Л.И.* Микробные ценозы торфяных почв и их функционирование. Минск: Наука и техника, 1983. 181 с.
18. *Классификация и диагностика почв России*. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
19. *Кураков А.В., Семенова Т.А.* Видовое разнообразие микроскопических грибов в лесных экосистемах южной тайги европейской части России // *Микология и фитопатология*. 2016. Т. 50. № 6. С. 367–378.
20. *Мегарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 181 с.
21. *Методы почвенной биохимии и микробиологии*. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
22. *Национальный атлас почв Российской Федерации / Под ред. Шоба С.А.* М.: Астрель: АСТ, 2011. 632 с.
23. *Полянская Л.М., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г.* Микробная биомасса в почвах // *Доклады АН*. 1995. Т. 344. № 6. С. 846–848.
24. *Широких И.Г., Широких А.А.* Антогонизм и резистентность к антибиотикам актиномицетов из почв трех особо охраняемых природных территорий // *Почвоведение*. 2019. № 10. С. 1203–1210.
25. *Широких И.Г., Широких А.А.* Почвенные актиномицеты национального лесного парка на северо-востоке Китая // *Почвоведение*. 2017. № 1. С. 86–92.
26. *Chater K.F., Biro S., Lee K.J., Palmer T., Schrempf H.* The complex extracellular biology of *Streptomyces* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 2. P. 171–198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x>
27. *Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H.* Compendium of soil fungi. Eching: IHW-Verlag, 2007. 672 p.
28. *Ellis M.B.* Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonw. Mycol. Inst., 1971. 607 p.

29. *El-Tarabily Khaled A.* Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber // *Can. J. Botan.* 2006. V. 84 № 2. P. 211–222.
<https://doi.org/10.1139/b05-153>
30. *Gams W.* Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Stuttgart: Fischer, 1971. 262 p.
31. *Hoog G.S.* The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. // *Studies in Mycology.* 1972. V. 1. 41 p.
32. *Juan-Ovejero R., Brionesa M.J.I., Öpikb M.* Fungal diversity in peatlands and its contribution to carbon cycling // *Appl. Soil Ecol.* 2020. V. 146. P. 103393.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103393>
33. *Naik G., Shukla S., Mall R., Mishra S.K.* Optimization of culture conditions of *Streptomyces zaomyceticus* RC 2073 by shake flask method // *Eur. J. Biomedical Pharmaceutical Sci.* 2015. V. 2. № 4. P. 620–629.
34. *Pitt J.I.* The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. L.: Acad. Press, 1979. 634 p.
35. *Thormann M.N.* Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective // *Can. J. Soil Sci.* 2006. V. 86. P. 281–293.
<https://doi.org/10.4141/s05-082>
36. *Thormann M.N.* The role of fungi in boreal peatlands // *Ecological Studies. Boreal Peatland Ecosystems* / Eds. Wieder R.F., Vitt D.H. Berlin: Springer-Verlag, 2006. V. 88. P. 101–123.
37. *Thormann M.N., Rice A.V.* Fungi from peatlands // *Fungal Diversity.* 2007. V. 24. P. 241–299.
38. *Ventorino V., Ionata E., Birolo L., Montella S., Marcolongo L., de Chiaro A., Espresso F., Faraco V., Pepe O.* Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. 2061.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02061>

The Mycelial Component of Eutrophic Peat Soils in the Zone of Active Organic Detritus Decomposition

A. V. Golovchenko^{1, *}, T. A. Gracheva¹, T. A. Semenova², A. A. Morozov^{1, 2}, S. R. Samigullina¹, T. V. Glukhova³, and L. I. Inisheva⁴

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117071 Russia

³Institute of Forest Science, Russian Academy of Sciences, Uspenskoe, Moscow oblast, 143030 Russia

⁴Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, 634061 Russia

*e-mail: golovchenko.alla@gmail.com

The analysis of structural indicators (abundance, diversity) of fungal and actinomycete complexes of eutrophic peat soils in the zone of active organic detritus decomposition, represented by litter (layers L and F) and eutrophic peat horizon (TE) was carried out. Samples were taken in swamp forests (black alder forest, pine forest, birch forest, mixed forest) of Tver and Tomsk regions (Russia) in the summer period of 2021. The abundance of mycelial organisms was analyzed by fluorescent-microscopic and plate methods. Species identification of culturable representatives was conducted basing on their phenotypic features. In the litter, the length of fungal mycelium (by 2–10 times), the number of culturable fungi (by 2–3 orders), and actinomycetes (by 1–2 orders) were higher than in the eutrophic peat horizon. The litter enzymatic layer (F) was characterized by the maximum carbon content of the mycelial component (3–10 mgC/g). The stocks of actinomycete biomass in the zone of active organic detritus decomposition varied from 23 to 60 kg/ha, fungal biomass from 1593 to 3718 kg/ha. The share of litter in the profile stock of mycelial biomass was greater in deciduous forests. Culturable fungi by 70 species of 43 genera and actinomycetes by 42 species from 12 series and 4 sections were isolated from the zone of active organic detritus decomposition. Representatives of genera *Penicillium*, *Talaromyces*, and *Trichoderma* dominated in the fungal complex, and *Streptomyces* dominated in the actinomycete complex. The litter was not inferior to the eutrophic-peat horizon in terms of species diversity of fungi and actinomycetes. The species similarity of fungi complexes of the litter and TE horizon was 0.68, and that of actinomycetes was 0.27.

Keywords: Sapric Histosols, litter, fungi, actinomycetes, biomass, species diversity, species similarity

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ

УДК 631.46

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОКАРИОТНОГО КОМПОНЕНТА СОВРЕМЕННЫХ, РЕЛИКТОВЫХ ПОЧВ И ГРУНТОВ АНТАРКТИДЫ

© 2023 г. Н. А. Манучарова^а*, М. А. Коваленко^а, М. Г. Алексеева^а,
А. Д. Бабенко^а, А. Л. Степанов^а

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 04.01.2023 г.

Принята к публикации 05.01.2023 г.

Установлены закономерности распространения и зависимости функциональной активности метаболически активных прокариот от основных экологических факторов. В исследовании применяли молекулярно-биологические и биоинформатические подходы. Спектр исследуемых образцов включал современные почвы Волгоградской, Тульской, Московской областей, Сибири и северной части Центральной Камчатки, реликтовые местообитания Волгоградской области и Центральной Камчатки, многолетнемерзлые грунты Антарктиды, о. Кинг-Джордж. Рассматривали воздействие антропогенных и абиогенных нагрузок на развитие прокариотного сообщества. В почвах, подверженных антропогенным или абиогенным нагрузкам, наряду с сокращением разнообразия и численности прокариот установлено увеличение количества генов, маркирующих способность сообщества к биодegradации ксенобиотиков, а также генов, кодирующих превращения азота и уровень метаболизма кофакторов и витаминов. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля. Археи играют ведущую роль в процессе нитрификации в ненарушенных почвах. Выявленные закономерности указывают на высокий метаболический потенциал прокариотного компонента рассматриваемых объектов и открывают возможности для биотехнологического использования штаммов, выделенных из реликтовых местообитаний.

Ключевые слова: бактерии, археи, функциональные гены, гидролитическое сообщество, нефть, азотный цикл

DOI: 10.31857/S0032180X22601311, **EDN:** IEWDLZ

ВВЕДЕНИЕ

К современным научным проблемам микробиологической технологии относятся выяснение свойств почв, способствующих сохранению разнообразия и получение консорциумов микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом (способностью к гидролизу природных полимеров и ксенобиотиков, азотфиксации, синтезу вторичных метаболитов).

Для сохранения биоразнообразия почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузок существенное значение имеет протекторная функция почвы – консервация в жизнеспособном состоянии различных переживающих стадий организмов. Основными механизмами перехода в покоящееся состояние является способность образовывать споры, цистоподобные покоящиеся клетки [6, 7], приобретать некультивируемое состояние [27]. Если способ-

ность образовывать споры является строго штаммо- и видоспецифичной чертой, то способность образовывать цистоподобные покоящиеся клетки, предназначенные для длительного выживания и сохранения вида, оказалась свойственна не только неспорообразующим, но и спорообразующим бактериям. Эта способность реализуется в случаях, когда спорообразование репрессировано, например, в условиях катаболитной репрессии [7, 8]. Особое значение феномен торможения жизненной активности приобретает в современной биотехнологии, в частности при хранении и приготовлении активного посевного спорового материала. Например, обработка спор микроорганизмов низкими температурами увеличивает выход конечного продукта, в частности антибиотиков, улучшает качество винной продукции, повышает урожайность сельскохозяйственных культур и содержание в них сахаров [5]. Такие реактивированные покоящиеся формы микроорганизмов ча-

сто обладают свойствами, отличными от их кол-лекционных аналогов, и могут использоваться в биотехнологии [38].

Значительный интерес представляют микро-организмы, выделенные из экстремальных местообитаний, по мнению некоторых авторов именно они характеризуются большей биологической активностью по сравнению со штаммами, выделенными из почв умеренных широт [8, 38]. Проблема представляет как практический (выявление продуцентов биологически активных веществ), так и теоретический интерес (изучение новых неисследованных ранее таксонов прокариот).

Усиление биотехнологических свойств микроорганизмов путем интродукции высокоактивных метафункциональных селекционных штаммов и создания условий для их деятельности в природных системах и агроценозах — один из перспективных подходов биоремедиации загрязненных систем.

Цель работы — выявление специфики развития прокариот, обладающих биотехнологическим потенциалом (осуществляющих деструкцию биополимеров, углеводов; способных к синтезу вторичных метаболитов; процессу азотфиксации) в почвенных экосистемах, установление закономерностей их распространения и зависимости функциональной активности от основных экологических факторов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись прокариотные сообщества современных почв (дерново-подзолистой, торфяной олиготрофной, чернозема, серой лесной, каштановой, бурой пустынно-степной), реликтовых местообитаний (подкурганые каштановые почвы, погребенные вулканические слоисто-пепловые почвы Камчатки), многолетне-мерзлых грунтов Антарктиды (табл. 1).

Исследовали воздействие антропогенного фактора на прокариотные сообщества почв как в природных экосистемах (например, на месте разлива нефти или поступления и накопления полициклических ароматических углеводов), так и в модельных опытах. При проведении модельных экспериментов применяли метод инициации микробной сукцессии увлажнением почвенных образцов водой (до 60% от массы почвы) и добавлением в опытные образцы ресурсов: биополимеров (хитина или пектина) в количестве 0.6% от массы почвы или углеводов в количестве, превышающем показатели сильнозагрязненных почв (20% от массы почвы) [30].

Для исследования почвенных прокариотных сообществ применяли молекулярно-биологические методы оценки (высокопроизводительное секвенирование и биоинформатический анализ

результатов с выявлением доминантов сообщества, обладающих различными биотехнологическими функциями).

Выделение ДНК. Из образцов почвы выделяли тотальную ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью PowerSoil DNA IsolationKit компании MOBio в соответствии с рекомендациями производителя в трехкратной повторности. Детекцию качества выделения ДНК проводили при помощи горизонтального гель-электрофореза с окрашиванием этидиум бромидом.

ПЦР в реальном времени гена 16S рРНК. Концентрацию очищенного препарата почвенной ДНК реакцию определяли на детектирующем амплификаторе DTLite4 (ДНК-Технология, Россия) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле в соответствии с рекомендациями производителя. Детектирующий амплификатор DTLite4 совмещает в себе функции программируемого термоциклера и оптической системы, позволяющей регистрировать флуоресценцию реакционной смеси в пробирках в ходе полимеразной цепной реакции. Использовали интеркалирующий краситель SYBR® Green и красители, связанные с праймерами (Lightcyaler — два зонда, связывающие ДНК-мишень на небольшом расстоянии друг от друга). 5'-конец одного зонда и 3'-конец второго содержат флуорофор-донор и флуорофор-акцептор. При их близком расположении флуорофор-донор поглощает свет определенной длины волны и переносит энергию на флуорофор-акцептор, по флуоресценции которого детектируют продукты амплификации. Реакционную смесь готовили из препарата *SuperMixEvaGreenBiorad*, концентрированный буфер с дезок-сирибонуклеотидами, полимеразой *Sso7d-fusion*, $MgCl_2$, красителем *EvaGreen* и стабилизаторами. Прибор калибровали по зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов.

Оценивали наличие копий генов, кодирующих синтез ферментов, направленных на деструкцию углеводов: алкан-монооксигеназы (*alkB* и *alkM*) (субстрат *n*-алканы) [28, 40], катехол-2,3-диоксигеназа (*xylE*) (субстрат катехолы и прокатехоевые кислоты), 1,2-гидроксиафталиндиоксигеназа (*nahC*) (субстрат нафталин) [14, 23, 30, 40]. Последовательности праймеров и температурные режимы амплификации представлены в табл. 2, 3.

Параллельно проводили оценку функциональной деятельности прокариотного сообщества посредством выявления наличия в системе генов, участвующих в процессах азотного цикла: *nifH* — нитрогеназная активность [20], *amoA* (АОВ) — монооксигеназная активность аммонийокисляющих бактерий [36], *amoA* (АОА) — монооксигеназная активность аммонийокисляющих архей [21],

Таблица 1. Исследуемые почвы

Почва	Название по WRB	Содержание гумуса, %	pH H ₂ O	Глубина отбора, см	Место отбора
Каштановая остаточно-солонцеватая глубокозасоленная среднеческая среднесуглинистая на лёссовидных суглинках (современная)	Haplic Arenic Kashtanozem	2.2	7.5	2–10	Волгоградская область 49.39936° N, 46.81083° E
Каштановая несолонцеватая незасоленная погребенная, 3.5 тыс. лет	Haplic Arenic Kashtanozem	0.8	8.3	50–61	Волгоградская область юг Приволжской возвышенности Камышинского района (курган Саломатино, XVI–XV вв. до н.э.)
Каштановая остаточно-солонцеватая незасоленная погребенная, 4.5 тыс. лет	Haplic Arenic Kashtanozem	0.1	7.6	206–215	Волгоградская область юго-восток Среднерусской возвышенности Клетского района в бассейне Дона (курган Перекопка, середина третьего тысячелетия до н.э.)
Вулканическая слоисто-охристая (современная)	Aluandic Andosols Dystric	2.1	5.8	10–20	Северная часть Центральной Камчатки Почвенно-пирокластический чехол северо-западного подножия вулкана Шивелуч 56°49'42" N, 161°19'28" E
Вулканическая слоисто-охристая Погребенная (2500 кал. л. н.)	Aluandic Andosols Dystric	2.5	6.2	110	Северная часть Центральной Камчатки почвенно-пирокластический чехол северо-западного подножия вулкана Шивелуч 56°49'42" N, 161°19'28" E

Таблица 1. Окончание

Почва	Название по WRB	Содержание гумуса, %	pH H ₂ O	Глубина отбора, см	Место отбора
Вечномерзлые грунты морской террасы, сильнопромытые флювиогляциальными водами Возраст отложений 7.5 тыс. лет	Antarctic permafrostrocks	0.1	7.2–9.8 (максимум на глубине 6.5 м)	940	о. Кинг-Джордж, станция Беллинсгаузен 62°10'04" N, 59°12'11" E
Бурая пустынно-степная песчаная почва	Luvic Calcisols	0.6	8.1	2–10	Пустыня Гоби 43°45'00" N, 111°50'00" E
Чернозем типичный среднемошной среднесуглинистый на лесосовидных суглинках	Voronnic Chernozems	8.0	7.5	10	Волгоградская область (модельный эксперимент) Волгоградская область (загрязнение нефтью в течение 7 лет) 51°1'41" N, 40°43'31" E
Серая лесная (обычная) мало-мощная среднесуглинистая на покровных суглинках	Haplic Luvisols (Abruptic)	5.1	6.9	15	Тульская область (модельный эксперимент) 53°58'23" N, 37°10'34" E
Дерново-подзолистая глеевая сверхглубокоосветленная	Umbric Luvisol	2.9	5.3	5–10	Московская область (почва на территории завода, загрязненная ПАУ, под лесной или под луговой растительностью) 55.728016° N, 38.217825° E
Торфяная олиготрофная (почва под нефтяной скважиной)	Fluvisol Histosol	5.4	4.1	0–10	Сибирь, Ханты-Мансийский район 61.31°24'71" N 70.26°76'10" E

Таблица 2. Последовательности праймеров для углеводородокисляющих генов

Ген	Фермент	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'–3')
<i>alkB</i>	Алкан-монооксигеназа	f TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGG r CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG
<i>alkM</i>	Алкан-монооксигеназа	f CCTGTCTCATTTGGCGCTCGTTCCTACAGG r GTGATGATCTGAATGTCGTTGTAAGTGG
<i>xyIE</i>	Катехол-2,3-диоксигеназа	f CCGCCGACCTGATC(A/T)(C/G)CATG r TCAGGTCA(G/T)CACGGTCA(G/T)GA f GTAATTGCGCCCTGGCTA(C/T)GTICA rGGTGTTCACCGTCATGAAGCG(C/G/T)TC
<i>nahC</i>	Нафталин-диоксигеназа	f CAAAA(A/G)CACCTGATT(C/T)ATGG R A(C/T)(A/G)CG(A/G)G(C/G)GACTTCTTTCAA

Таблица 3. Температурные условия для программы RT-PCR, использованные в работе для определения наличия генов в исследуемых образцах

Функциональный ген	<i>alkB</i>	<i>alkM</i>	<i>xyIE</i>	<i>nahC</i>
Температурный профиль	1 × 94°C 5 мин 30 × 94°C 1 мин 60°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 3 мин 1 × 4°C – hold	1 × 94°C 5 мин 30 × 94°C 1 мин 60°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 3 мин 1 × 4°C – hold	1 × 95°C 5 мин 35 × 94°C 1 мин 61.5°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 10 мин 1 × 4°C – hold	1 × 94°C 10 мин 30 × 95°C 1 мин 49°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 3 мин 1 × 4°C – hold

Таблица 4. qPCR-праймеры и температурные условия, использованные в работе для определения наличия генов, участвующих в цикле азота

Праймер	Последовательность (5'–3')	Температурный профиль
<i>nifH</i> : Forward Reverse	GGTTGTGACCCGAAAGCTGA GCGTACATGGCCATCATCTC	94°C 1 мин; 94°C 30 с, 50°C 1 мин, 72°C 30 с – 40 циклов; 72°C 10 мин
<i>amoA</i> (АОВ): <i>amoA</i> -1F <i>amoA</i> -2R	GGG GTT TCT ACT GGT GGT CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	95°C 10 мин; 94°C 45 с, 58°C 45 с, 72°C 45 с – 39 циклов; 95°C 15 с, 60°C 30 с, 95°C 15 с
<i>amoA</i> (АОА): 23F CrenamoA616	ATG GTC TGG CTW AGA CG GCC ATC CAB CKR TAN GTC CA	94°C 45 с, 55°C 45 с, 72°C 45 с – 39 циклов; 95°C 15 с, 60°C 30 с, 95°C 15 с
<i>nirK</i> : <i>nirK</i> 876 <i>nirK</i> 1040	ATY GGC GGV CAY GGC GA GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT	95°C 15 мин; 95°C 15 с, 60°C 30 с, 72°C 30 с, 80°C 15 с – 40 циклов; 95°C 15 с, 72°C 30 с

а также *nirK* – нитратредуктазная активность [24]. Последовательности праймеров и температурные режимы амплификации представлены в табл. 4.

Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программы RT-PCR.

Секвенирование и метагеномный анализ. Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с помощью вырожденных праймеров, компле-

ментарных последовательностям как бактерий, так и архей: 341F (CCTACGGGRBGCASCAG) и 806R (GGACTACYVGGGTATСТААТ). Протокол реакции (температурный профиль): 95°C – 3 мин → (95°C – 10 с → 50°C – 10 с → 72°C – 20 с) × 49 циклов. Полученные ПЦР-фрагменты очищали на колонках QIAquick (согласно протоколу производителя). Каждый ПЦР-фрагмент растворяли в

50 мкл ТЕ-буфера, полученного материала было достаточно для дальнейшего анализа. Высокопроизводительное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК проводили с использованием прибора GS FLX (Roche, Швейцария) по протоколу Titanium с использованием набора GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+ и пикотитровальной пластины GS Titanium PicoTiterPlate Kit 70–75. Получены ПЦР-фрагменты препаратов метагеномной ДНК с помощью вырожденных праймеров PRK341F и PRK806R, созданы библиотеки, пригодные для секвенирования и далее определены нуклеотидные последовательности переменных фрагментов генов 16S рРНК при помощи секвенатора. Анализ полученных данных проводили при помощи Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) [15]. С помощью инструментов программы осуществляли: 1) проверку качества секвенирования и создание библиотеки сиквэнсов; 2) формирование ОТЕ (OTU picking) *de novo* на основе 97, 94, 91, 88, 85, 81% порога сходства сиквэнсов методом UCLUST [18]; 3) удаление синглтонов (singletons – ОТЕ, содержащих только один сиквэнс) и последовательностей, относящихся к растительным хлоропластам; 4) определение филогенетического состава сообществ на разных таксономических уровнях при помощи базы данных разнообразия гена RDP classifier [40] и построения филогенетического дерева при помощи алгоритма FastTree [35]; 5) расчет показателей общего разнообразия прокариотных сообществ (альфа-разнообразия): видового богатства, индекса Шеннона ($H = -\sum p_i \ln p_i$, где p_i – доля i -го вида в сообществе), индекса Chao1, оценивающего предположительное реальное количество ОТЕ в сообществе $Chao1 = S_{obs} + a/2b$, где S_{obs} – число обнаруженных ОТЕ, a – число ОТЕ, содержащих 1 сиквэнс, b – число ОТЕ, содержащих 2 сиквэнса), индекса филогенетического разнообразия (PD) [19] (при расчете индексов разнообразия проводили нормализацию данных по образцу с минимальным числом полученных сиквэнсов); 6) анализ сходства структуры бактериальных сообществ (бетаразнообразия) при помощи метрики Брея–Кертиса [13]. Визуализацию результатов анализа бета-разнообразия проводили при помощи построения двумерных диаграмм по методу главных компонент. Статистический анализ достоверности различий между группами проводили при помощи непараметрического метода permutational ANOVA/MANOVA (PERMANOVA) [10].

Относительная доля родов в образцах представляет собой отношение количества последовательностей, относящихся к таксону, к общему количеству прочтенных последовательностей в образце после нормализации. Поскольку проанализировали большое количество последовательностей, относившихся к различным родам прокариот,

провели выборку доминантных родов, относительная доля которых в образцах была $\geq 1\%$.

Функциональное разнообразие генов в микробных сообществах предсказывали при помощи программы PICRUSt [29]. Процесс предсказания функциональных генов по результатам секвенирования 16S рРНК состоял из двух этапов. На первом этапе производили предсказание встречаемости генов для каждого отдельно взятого организма согласно референсному филогенетическому дереву GreenGenes phylogenetic tree of 16S sequences [17]. Затем сопоставляли предсказанные гены для каждого таксона с относительной встречаемостью данного таксона в образце, оцененному по 16S рРНК. Таким образом осуществляли оценку встречаемости гена в образце. Для сопоставления 16S рРНК с уже секвенированными полными геномами использовали базу бактериальных и архейных геномов IMG database [31]. Функциональную классификацию проводили согласно схеме Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Orthology (KOs) [26].

Дальнейшую обработку результатов вели в программе QIIME [15]. При помощи инструментов программы осуществляли удаление синглтонов и нормализацию данных по образцу с наименьшим количеством определенных генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Современной задачей любого биолога является полифазный подход к изучению живой системы, включающий характеристику как консервативного, так и функционального геномов. В связи с этим интересным представляется вопрос о субстратной специфичности и активности работы ферментных систем в зависимости от принадлежности микробной популяции к той или иной климатической зоне или вертикальной ярусности, обнаружения функциональных генов в образцах исследуемых почв, отвечающих за возможность самовосстановления микробного сообщества.

С применением молекулярно-биологических методов исследовано прокариотное сообщество погребенных почв, характеризующееся доминированием представителей филума *Actinobacteria*, которое становится более выраженным при внесении субстрата (биополимера хитина) (рис. 1). Представители рода *Phenylobacterium* [32] эффективно разлагающего хлоридазон, антипирин и пирамидон, являющиеся активными труднорастворимыми компонентами гербицидов, и род *Janthinobacterium*, известный своими бактерицидными, фунгицидными и вироцидными свойствами благодаря высокому содержанию виолацеина в клетках [1, 34]. Стоит отметить доминирование рода *Chitinophaga*, являющегося продуцентом но-

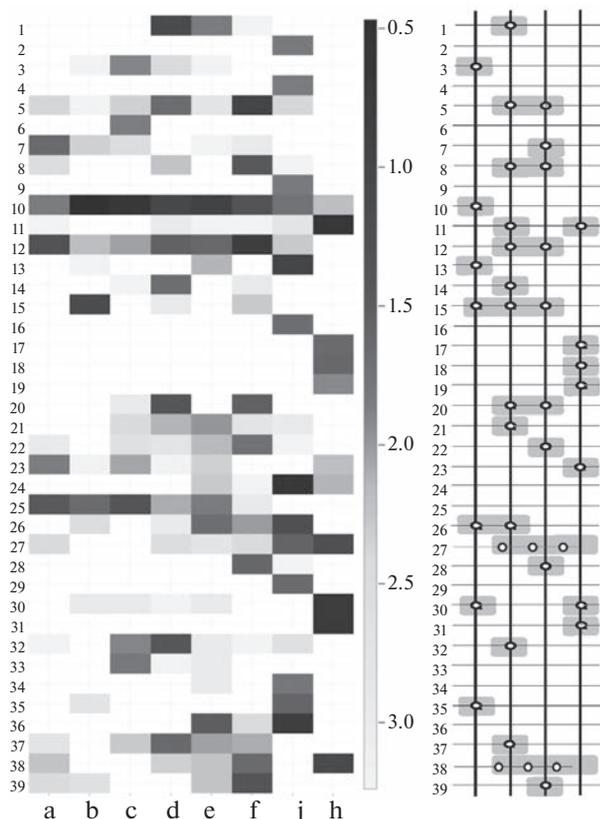


Рис. 1. Доминирующие роды прокариот в исследованных образцах и их относительная доля, проиллюстрированная с помощью (ОТЕ выделены на уровне 97% сходства; приведены только ОТЕ, идентифицированные на уровне рода; за доминантные приняты роды, составляющие >1% от всех выделенных ОТЕ; приведены значения десятичного логарифма от доли рода). На схеме справа приведены роды, относительная доля которых увеличивается при внесении хитина. а – современная каштановая почва; б – современная каштановая почва; инкубированная с хитином; с – почва, погребенная 3500 л. н.; д – почва, погребенная 3500 л. н., инкубированная с хитином; е – почва, погребенная 3500 л. н.; ф – почва, погребенная 4500 л. н., инкубированная с хитином; ж – многолетнемерзлый грунт; з – многолетнемерзлый грунт, инкубированный с хитином. Роды: 1 – *Saccharothrix*, 2 – *Corynebacterium*, 3 – *Agromyces*, 4 – *Rhodococcus*, 5 – *Streptomyces*, 6 – *Euzeyba*, 7 – *Rubrobacter*, 8 – *Chitinophaga*, 9 – *Sediminibacterium*, 10 – *Bacillus*, 11 – *Brevibacillus*, 12 – *Paenibacillus*, 13 – *Bacillus* (rRNA group 2), 14 – *Paenisporosarcina*, 15 – *Solibacillus*, 16 – *Staphylococcus*, 17 – *Clostridium*, 18 – *Coprococcus*, 19 – *Sedimentibacter*, 20 – *Mycoplana*, 21 – *Phenylobacterium*, 22 – *Devosia*, 23 – *Rhodoplanes*, 24 – *Rhizobium*, 25 – *Kaistobacter*, 26 – *Sphingobium*, 27 – *Sphingomonas*, 28 – *Achromobacter*, 29 – *Schlegelella*, 30 – *Variovorax*, 31 – *Cupriavidus*, 32 – *Janthinobacterium*, 33 – *Peredibacter*, 34 – *Halomonas*, 35 – *Acinetobacter*, 36 – *Pseudomonas*, 37 – *Stenrobacter*, 38 – *Lysobacter*, 39 – *Thermomonas*.

вого антибиотика фальцитидина, обладающего активностью в отношении малярии, в образцах с субстратом [2, 37].

Прокариотное сообщество многолетнемерзлых грунтов отличаются по родовому составу от

рассматриваемых погребенных каштановых почв. Так, доминирующим родом в образцах грунтов становится *Sediminibacterium*, необнаруженный в почвенных образцах (рис. 2). В вариантах с добавлением биополимера хитина гидролитической активностью обладали роды *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes*, *Cupriavidus*, отсутствовавшие в почвенных образцах. Роды *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes* являются облигатными анаэробами [25].

Ранее исследовали биоразнообразие прокариотного комплекса современных почв в условиях микроскопов (чернозема, серой лесной и каштановой почв) до и после их загрязнения углеводородами. Установлено, что при внесении субстрата альфа-разнообразие уменьшалось за счет выхода в доминанты определенных родов – автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий [30]. Установлено уменьшение микробного разнообразия и смена метаболически активных доминантов – представителей доменов Bacteria и Archaea в микроскомах, загрязненных нефтью, по сравнению с контрольными образцами в процессе микробной сукцессии. В опытных образцах исследуемых почв, загрязненных углеводородами, выявлено формирование специфического комплекса бактерий и архей. Определены метаболически активные и неактивные в отношении нефтяного загрязнения представители почвенного прокариотного комплекса. Эти результаты опубликованы ранее [30].

Определено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микрофлоры, различающихся в зависимости от типа почв. Для образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт – протеобактериям. Среди актинобактерий в этих вариантах опыта доминировали представители следующих групп: субкласс Rubrobacteridae (роды *Gaiella*, *Solirubrobacter*); субкласс Actinobacteridae (субпорядок Propinobacterineae (*Nocardiodetes*, *Kribbella*); Micromonosporineae (*Catelliglobospora*, *Micromonospora*); Corynebacterineae (*Rhodococcus*); Pseudonocardineae (*Pseudonocardia*); Micrococccineae (*Cellulomonas*, *Agromyces*); Streptomycineae (*Streptomyces*); Streptosporangineae (Thermomonosporaceae, *Streptosporangium*). Отметим, что многие представители родов *Ilumatobacter*, *Aciditerrimonas*, принадлежащих группе актинобактерий, обнаруженных в исследуемых образцах с нефтью, способны расти в анаэробных условиях и обладают термо- и ацидофилией [39].

Структура бактериального комплекса в загрязненном нефтью торфе изменялась по сравнению с контрольной почвой [30]. Доля филума *Proteobacteria* возрастала до 50% от всех выявляемых



Рис. 2. Анализ методом главных компонент с применением метрики Брея–Кертиса структуры прокариотных сообществ исследуемых образцов с добавлением субстратов (биополимера хитина или углеводов).

бактерий (ранее опубликованные данные) [30]. Среди протеобактерий обнаружены альфа-, гамма- и бета-протеобактерии. Стоит отметить, что увеличение количества протеобактерий происходит за счет появления видов, которые не встречались в незагрязненной почве, например *Sulfuritalea*, принадлежащим к *Betaproteobacteria* семейству Sterolibacteriaceae. Данный организм является хемолитоавтотрофом, окисляющим тиосульфаты, серу и водород [12]. Согласно литературным источникам, его используют для деградации ароматических соединений, в частности, для анаэробного разложения бензоатов и фенилацетатов [13].

Анализ бета-разнообразия методом главных компонент с применением метрики Брея–Кертиса на уровне сходства 97% достоверно разделил доминанты гидролитического сообщества между исследуемыми образцами на четыре кластера: современные почвы южных широт (каштановая, чернозем), современные почвы северной и центральной частей России (дерново-подзолистая, торфяная), погребенные почвы и многолетнемерзлые грунты (рис. 2). Такое разделение указывало на то, что при внесении ресурса (биополимера хитина или углеводорода нефти) доминанты гидролитического сообщества различались между образцами современных почв, принадлежащих разным климатическим зонам, реликтовыми почвами и грунтами, следовательно, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонентов гидролитического комплекса.

Таким образом, определено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микро-

флоры, различающихся в зависимости от типа почв, который в свою очередь оказывает координирующее влияние на развитие доминантных компонентов гидролитического комплекса.

При анализе функционального генетического разнообразия прокариотного сообщества выявлено, что количество генов, маркирующих способность сообщества к биодegradации ксенобиотиков, выше в погребенных почвах и многолетнемерзлых грунтах по сравнению с современными почвами (рис. 3). Уровень метаболизма ксенобиотиков повышается от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. Это касается таких ксенобиотиков, как толуол, стирол, полициклические ароматические углеводороды, нафталин, флуоробензоат, диоксин, хлороциклогексан, хлорбензен, хлоралканы и хлоралкены, капролактамы, бисфенолы, бензоат, атразин и аминоксенобиотиков. Увеличение интенсивности разложения ксенобиотиков отмечали И.П. Соляникова с соавт. [4]. Показано, что при переводе штамма *Pseudomonas fluorescens* в покоящееся состояние и последующем выводе из него происходило выщепление фенотипов, характеризовавшихся большей скоростью роста на ароматических субстратах. Поскольку известным является факт, что для биоремедиации целесообразно использовать не отдельные штаммы бактерий-деструкторов, а активные ассоциации, следовательно погребенные местообитания могут иметь биотехнологический потенциал для ремедиации загрязнений ксенобиотиками.

Установлено, что потенциальная активность, измеренная по относительному отклику при внесении субстрата, микробного гидролитического сообщества возрастает в ряду от современной к

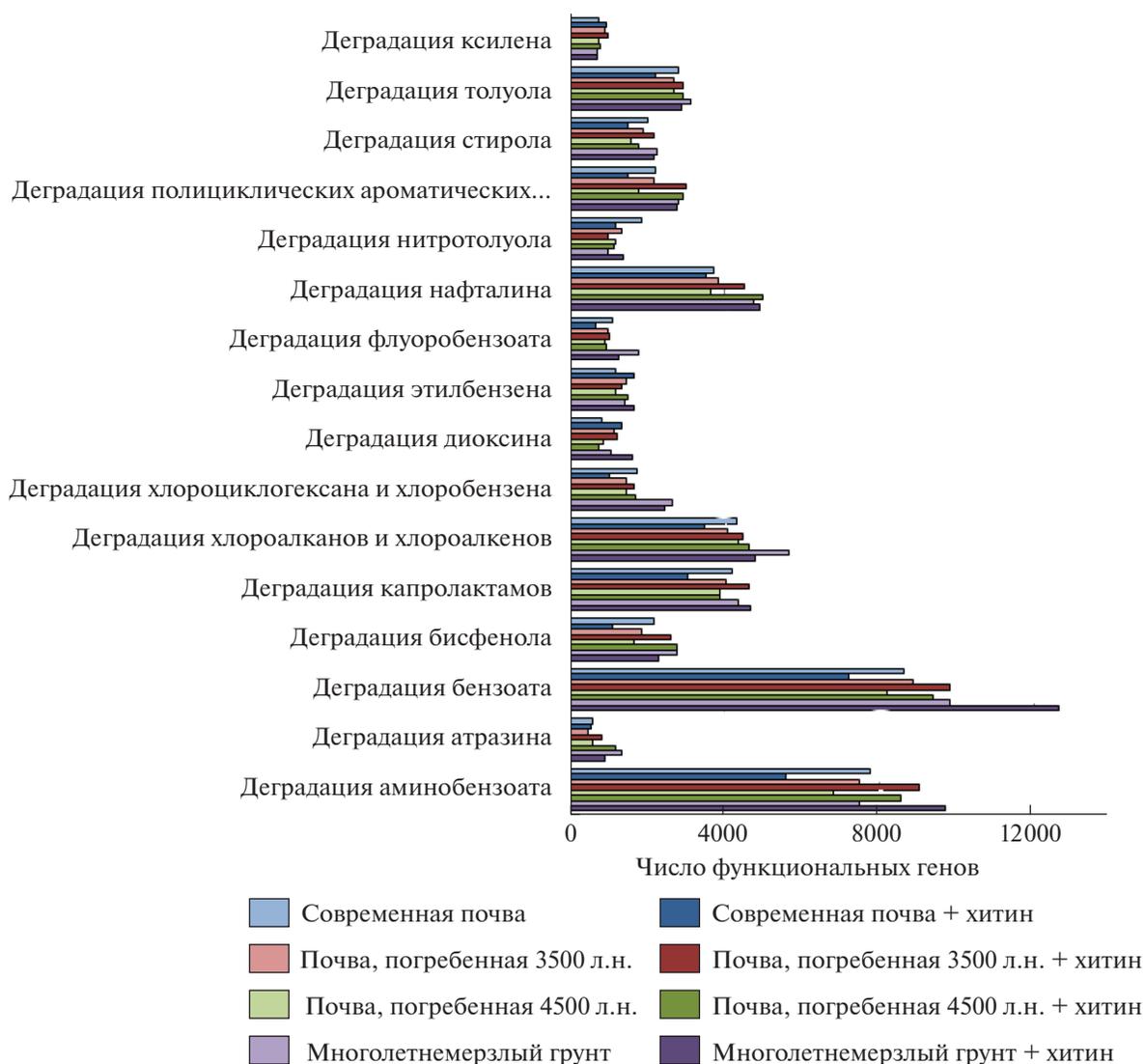


Рис. 3. Биодegradация ксенобиотиков (KEGG классификация уровень 2, абсолютные величины).

палеовулканической почве. Внесение ресурса-субстрата увеличивает долю генов, ответственных за деградацию ксенобиотиков. Например, при внесении полисахарида (хитина) увеличивается количество генов, ответственных за деградацию полициклических ароматических углеводородов. Стоит заметить, что присутствие функционального гена не обязательно означает его активность, однако позволяет говорить о потенциальной возможности к осуществлению процессов, кодируемых данными генами. Наибольшее число функциональных генов, маркирующих процессы биодegradации ксенобиотиков, обнаружено в образцах многолетнемерзлых грунтов, что говорит о высоком биотехнологическом потенциале реликтовых микробных сообществ.

Многие незамещенные ароматические углеводороды (бензол, нафталин) расщепляются бакте-

риями до катехола или прокатеховой кислоты. Бензоат является центраболитом деградации многих ароматических углеводородов. В рассматриваемых сообществах почв, перечисленных в табл. 1, присутствовали бактерии, обладающие двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата, которые катаболизируют бензоат до катехола.

При разрыве ароматического кольца в метарасщеплении участвуют ферменты катехол-2,3-диоксигеназа, 1,2-гидрокси-нафталиндиоксигеназа, которые кодируются соответствующими генами: *xylE* [22], *nahC* [22] и *dmpB* [11], ответственными за преобразование субстратов в полуальдегиды, которые при дальнейшей трансформации образуют пируваты, ацетальдегиды, оксалоацетаты, фумараты, сукцинаты и иные вещества, вовлекаемые в промежуточный метабо-

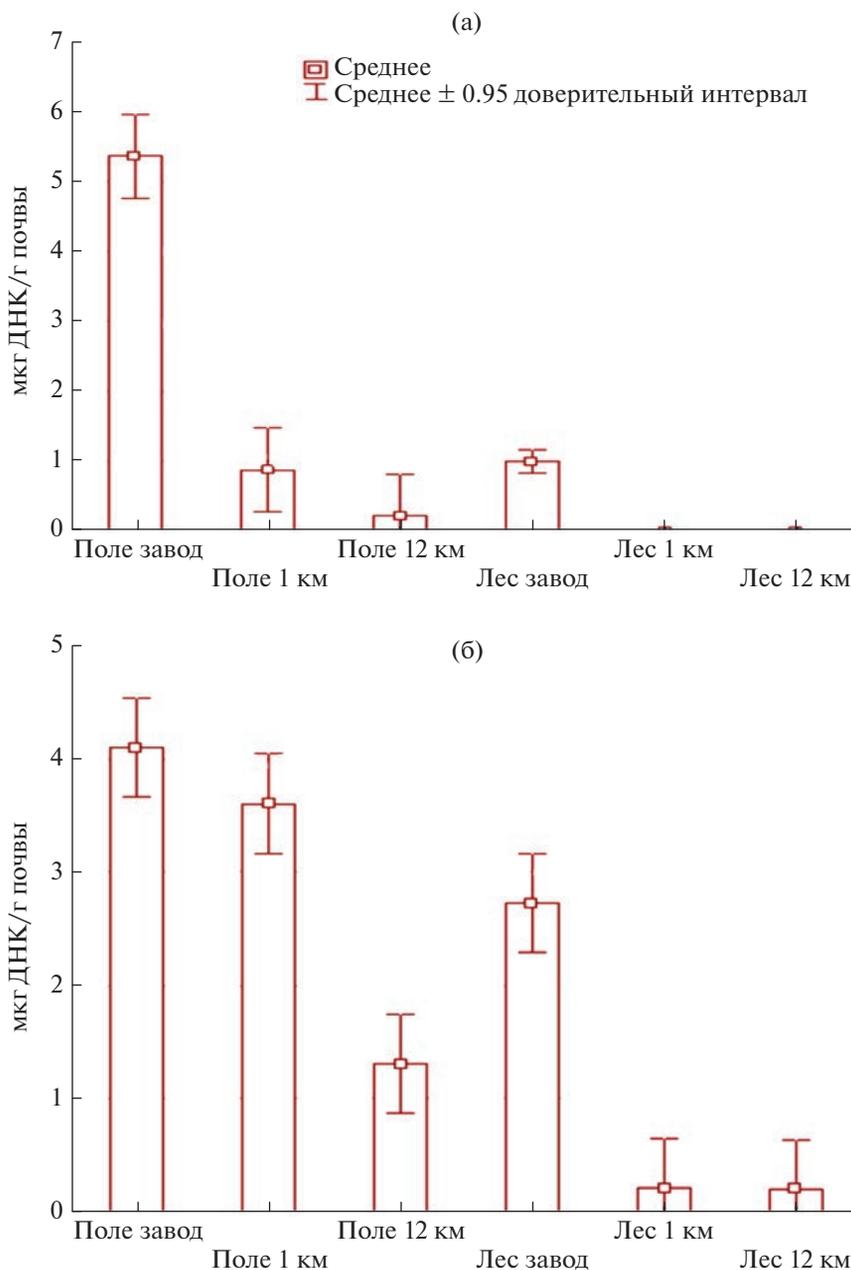


Рис. 4. Содержание копий гена (мкг ДНК/г) *nahC* (а) и *xylE* (б) в исследуемых образцах дерново-подзолистой почвы.

лизм. У бактериальных сообществ предсказано наличие всех ферментов катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. В сообществах дерново-подзолистой и торфяной почв за деградацию бензоата отвечали представители Alphaproteobacteria родов *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* и *Pseudolabrys*.

При исследовании загрязненных современных дерново-подзолистых почв на территориях угледобывающего завода или под нефтяными скважинами с использованием количественного анализа qPCR числа копий функциональных генов *nahC*, *xylE* показано, что наибольшее их со-

держание (5.4, 4.2 мкг ДНК/г почвы соответственно) обнаружено в образцах, отобранных непосредственно на территории завода, и уменьшалось по мере удаления от него (рис. 4а, 4б). Схожие закономерности прослеживались для почвенных образцов, отобранных как под лесом, так и под лугом.

Исследования проводили в разные сроки загрязнения поллютантом. В образцах чернозема с длительным сроком воздействия углеводородов (более 7 лет) отмечалось наибольшее содержание исследуемых генов *xylE* 18×10^3 копий/мл, тогда как в контрольных, незагрязненных вариантах —

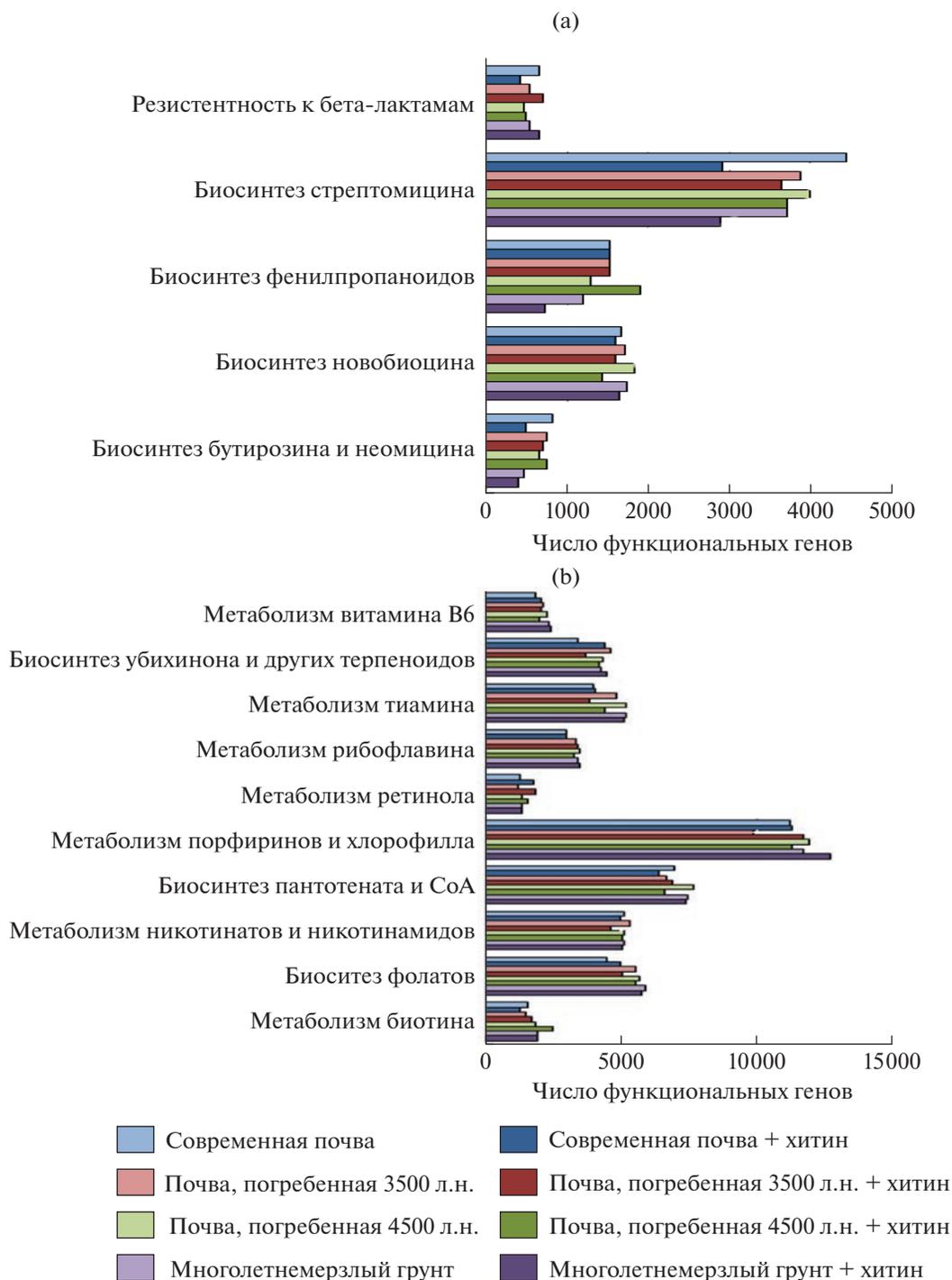


Рис. 5. Биосинтез вторичных метаболитов (а), метаболизм ко-факторов и витаминов (б).

их наименьшее содержание 6×10^3 копий/мл. В вариантах свежего нефтяного разлива обнаружено повышенное содержание копий функциональных генов по сравнению с контролем, что может говорить об активной работе метаболически активного микробиологического сообщества, способного к деструкции углеводов. Анализ современной литературы свидетельствует

о высоком микробном потенциале деструкции нефти в почве, который катастрофически снижается из-за формирования анаэробных условий в результате промышленного разлива нефти и нефтепродуктов.

Биосинтез вторичных метаболитов, к которым относятся такие антибиотики, как стрептомицин, новобиоцин, бутирозин, неомицин снижается в

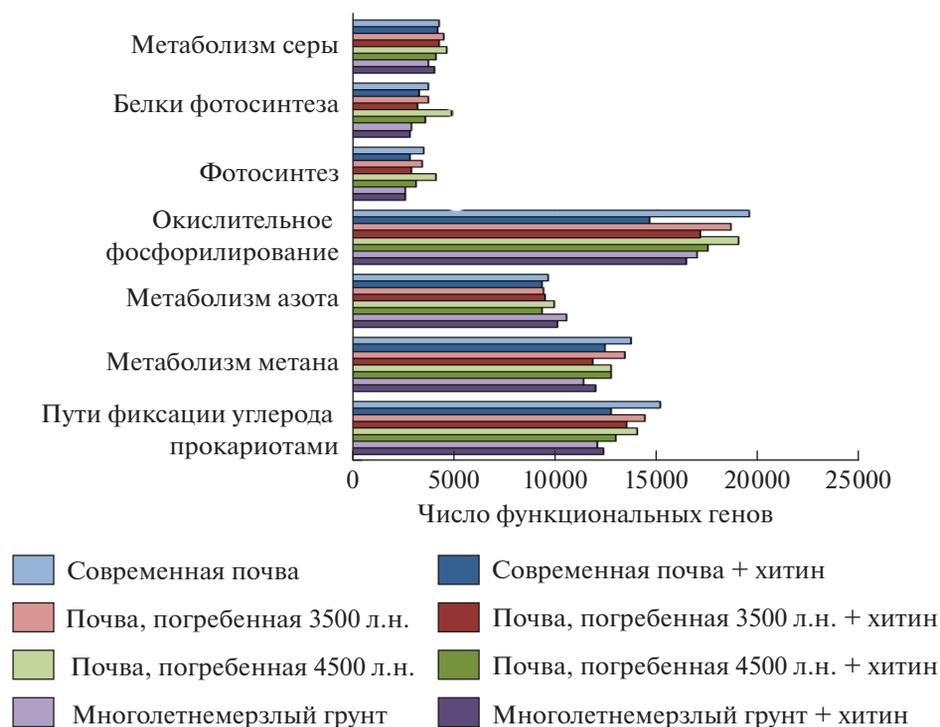


Рис. 6. Основные метаболические процессы, осуществляемые микробными сообществами исследуемых почв и грунтов.

ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам (рис. 5а). Биосинтез антибиотиков группы тетрациклина и ванкомицина примерно одинаков во всех образцах. Несмотря на то, что ранее выявлено, что штаммы, выделенные из многолетнемерзлых грунтов, обладают большей антибиотикоустойчивостью [3], количество генов, кодирующих резистентность к бета-лактамам, в исследуемых образцах не различалось. Уровень метаболизма кофакторов и витаминов в целом повышается в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам (рис. 5b). Метаболизм липидов слабо различается между образцами, однако в образцах многолетнемерзлых грунтов повышен синтез глицерофосфолипидов и метаболизм жирных кислот.

Количество генов, кодирующих фотосинтез и окислительное фосфорилирование, закономерно снижалось при переходе от современных почв к погребенным и от погребенных к многолетнемерзлым породам.

Обращает внимание количество генов, кодирующих превращения азота, которое повышено в многолетнемерзлых породах (рис. 6). Показано наличие ряда ключевых генов цикла азота (*nifH*, *amoA*, *nirK*) как в современном, так и погребенном горизонтах исследуемых почв. Наличие копий гена *nifH* бактерий азотфиксаторов, способных обеспечить систему азотом, можно рассматривать как один из этапов самовосстановления почв.

В современных почвах количество генов, отвечающих за возможность фиксации молекулярного азота из воздуха, было больше по сравнению с погребенными и достигало 4.54×10^6 копий гена/г почвы, для погребенного горизонта 2.5×10^4 копий гена/г почвы (рис. 7). Внесение субстрата как в погребенную, так и в современную почвы снижало содержание генов *nifH*. Такую особенность можно объяснить наличием в почве с полимерами (особенно хитином) доступных для микроорганизмов форм азота, что приводит к интенсификации процессов минерализации и снижению нитрогеназной активности. Важно отметить присутствие, хотя и незначительное, гена *nifH* в более глубоких слоях почвы, что указывает на возможный потенциал обитающих там микробных сообществ. Экстремальные среды обитания являются ценным источником ферментов, применимых в прикладных и промышленных областях [8]. На сегодняшний день известны прокариоты, выделенные из экстремальных сред, синтезирующие широкий спектр органических кислот, продуцирующие молекулярный водород, способные к фиксации атмосферного азота в условиях значительно отличающихся от принятых для этих процессов оптимумов, что позволяет вовлекать эти организмы в процессы ремедиации и промышленного синтеза различных веществ [8].

В последние годы интенсивно изучаются архейные сообщества почв, осуществляющие окис-

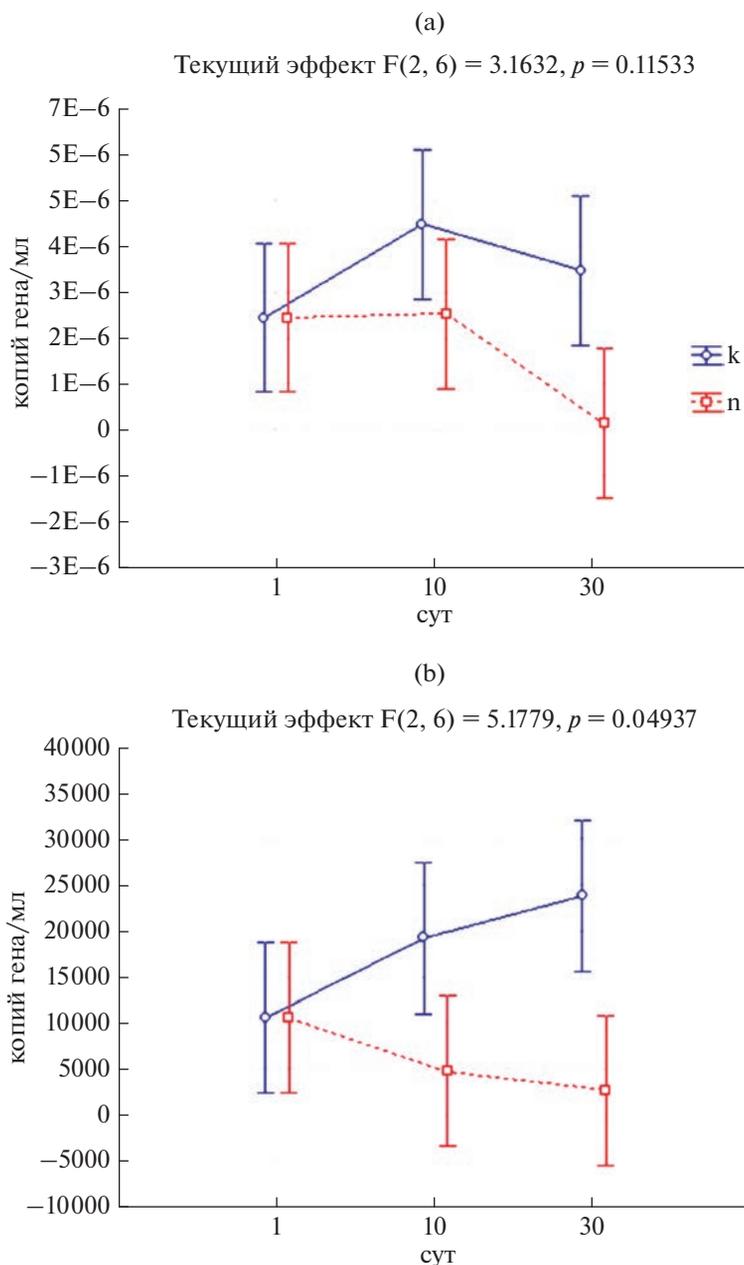


Рис. 7. Динамика присутствия гена *nifH* в современном (а) и погребенном горизонте (б) вулканической перегнойно-охристой почвы с добавлением субстратов (n) и в контроле (k). F – критерий Фишера (отношение выборочных дисперсий), p – значение. Для каждого значения представлены средние величины и стандартные отклонения. 0.95 доверительный интервал.

ление аммония [9], что изменило представления о микробных процессах трансформации азота в почвах. В параллельной серии опытов проведена амплификация ключевого гена нитрификации. Для вулканических почв (как современных, так и погребенных) удалось выявить наличие генов аммоний окисляющих бактерий и архей. Следует отметить увеличение концентрации гена в погребенных образцах к 30 сут сукцессии в контрольных вариантах и варианте с нефтью, что указыва-

ет на реактивацию нитрификаторов к концу сукцессии. Динамика присутствия гена *amoA* в современном горизонте вулканической перегнойно-охристой почвы демонстрирует увеличение его концентрации в бактериальном комплексе в вариантах с нефтью (2.3×10^7 копий ДНК/г почвы) к 10 сут сукцессии. В контроле отмечены низкие содержания гена. В архейном комплексе отмечается увеличение концентрации гена в контрольном варианте к 30 сут (2.5×10^6 копий ДНК/г

почвы), в то время как в варианте с нефтью показатели остаются очень низкими. На основании полученных данных можно сделать вывод, что в почвах без внесения нефти (ненарушенное сообщество) ведущую роль в процессе нитрификации играют археи. Аналогичные результаты получены в работах [9, 16, 33]. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а также его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля. Вклад архей в процесс нитрификации уменьшается при внесении нефти, а также уменьшается с глубиной.

В ходе сукцессии в образцах вулканической перегнойно-охристой почвы обнаружены копии гена *nirK*, использующиеся в качестве молекулярного маркера денитрификации, во всех вариантах опыта (контроль, нефть). Абсолютные значения были наибольшими в современном горизонте (1.25×10^7 копий ДНК/г.п.), в погребенном горизонте они были ниже на два порядка (1.2×10^5 копий ДНК/г.п.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе исследований для характеристики биотехнологического потенциала микробного комплекса оценено разнообразие прокариотной составляющей почвенного микробного сообщества; выявлена способность почвенных систем к процессам, направленным на деградацию труднодоступных соединений, трансформацию окисленных и восстановленных форм азота, определено наличие функциональных генов у микроорганизмов, способных к метаболической активности в почвах, различающихся параметрами основных экологических факторов.

Установлено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микрофлоры, различающихся в зависимости от типа почв, который в свою очередь оказывает координирующее влияние на развитие доминантных компонентов гидролитического комплекса.

При анализе функционального генетического разнообразия бактериального сообщества (методом восстановления полного метагенома по данным высокопроизводительного секвенирования) установлено, что количество генов, маркирующих способность сообщества к биодеградации ксенобиотиков, кодирующих превращения азота и уровень метаболизма кофакторов и витаминов, больше в реликтовых образцах по сравнению с современными. Показано, что инициация системы ресурсом увеличивает долю генов, ответственных за деградацию ксенобиотиков. Например, при внесении полисахарида повышалось количество генов, ответственных за деградацию полициклических ароматических углеводов.

Стоит отметить, что присутствие функционального гена не обязательно означает его активность, однако позволяет говорить о потенциальной возможности к осуществлению процессов, кодируемых данными генами.

По данным сравнительного количественного анализа генов из разных типов исследуемых почв сделан вывод, что архейные сообщества являются самой многочисленной группой аммоний окисляющих прокариот в почвах. Интерес к исследованию этой группы организмов определяется не только важнейшей ролью нитрификации в азотном цикле почв, но и решением практических вопросов, например, доступностью азота в условиях пониженной концентрации кислорода. Результаты исследований позволят разработать новые подходы биоремедиации почв от загрязнения углеводородами.

Предположительно, доминанты древних гидролитических прокариотных сообществ могут обладать большей активностью по сравнению с их коллекционными аналогами. Из погребенных образцов выделены штаммы бактерий, обладающие высокой гидролитической активностью, которые в дальнейшем могут быть использованы для биотехнологических целей (например, для создания биопрепаратов при борьбе с фитопатогенами).

Выявленные закономерности указывают на высокий метаболический потенциал прокариотного компонента рассматриваемых объектов и открывают возможности для биотехнологического использования штаммов, выделенных из погребенных почв и многолетнемерзлых грунтов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (регистрационный номер 122090800042-2) в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации № 2515-р от 2 сентября 2022 г. в целях реализации важнейшего инновационного проекта государственного значения, направленного на создание единой национальной системы мониторинга климатически активных веществ. Микробиологические исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00076). Отбор образцов выполнен в рамках темы государственного задания “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта научных интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Юрченко Е.Н., Якушев А.В., Манучарова Н.А., Лысак Л.В., Костина Н.В. Структура и функции бактериальных сообществ регрессивных пятен верхового торфяника. *Микробиология*. 2020. Т. 89. № 1. С. 111–120. <https://doi.org/10.31857/S0026365620010061>
2. Кольцова Е.М. Структурно-функциональная характеристика гидролитической составляющей реликтовых прокариотных сообществ. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2017. 139 с.
3. Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Баслеров Р.В., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала изолятов из вечномерзлых осадочных пород *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii* и их коллекционных аналогов // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 1. С. 27–41. <https://doi.org/10.7868/S0026365613010059>
4. Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Влияние состояния покоя на штамм *Pseudomonas fluorescens* 26K – деструкторксенобиотиков // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 5. С. 552. <https://doi.org/10.7868/S0026365613050145>
5. Феофилова Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2003. Т. 39. № 1. С. 5–24. <https://doi.org/10.1023/A:1021774523465>
6. Эль-Регистан Г.И. Покой как форма адаптации микроорганизмов // *Механизмы выживания бактерий*. М.: Медицина, 2005. С. 11–142. <https://search.rsl.ru/ru/record/01002681279>
7. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456. <https://doi.org/10.1134/S0026261706040035>
8. Abraham W.R., Nogales B., Golyshin P.N., Pieper D.H., Timmis K.N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. V. 5. № 3. P. 246–53. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00323-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00323-5)
9. Adair K.L., Schwartz E. Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA // *Microb. Ecol.* 2008. V. 56. P. 420–426. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9360-9>
10. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance // *Austral. Ecol.* 2001. V. 26. P. 32–46. https://www.pelagicos.net/MARS6300/homework/hw6/Anderson_2001.pdf
11. Bartilson M., Nordlund I., Shingler V. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase encoding gene of phenol catabolizing *Pseudomonas* CF600 // *Gene*. 1989. V. 85. P. 233–238. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90487-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90487-3)
12. Boden R., Hutt L.P., Rae A.W. Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the *Hydrogenophilales* to the *Nitrosomonadales*, proposal of *Hydrogenophilalia* class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders *Nitrosomonadales* and *Rhodocyclales* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1191–1205. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001927>
13. Bray J.R., Curtis J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin // *Ecol. Monogr.* 1957. V. 27. № 4. P. 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
14. Bürgmann H., Widmer F., Sigler W.V., Zeyer J. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 1928–1935. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1928-1935.2003>
15. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 5. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
16. Chen J., Del Genio A.D., Carlson B.E., Bosilovich M.G. The spatiotemporal structure of twentieth-century climate variations in observations and reanalyses. P. I: Long-term trend // *J. Climate*. 2008. V. 21. P. 2611–2633. <https://doi.org/10.1175/2007JCLI2011.1>
17. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T. et al. Greengenes, a chimeric-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 7. P. 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
18. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–1. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
19. Faith D.P., Baker A.M. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges // *Evol. Bioinform. Online*. 2006. V. 2. P. 121–128. <https://doi.org/10.4137/ebo.s0>
20. Gaby J.C., Buckley D.H. A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria // *Database (Oxford)*. 2014. V. 2014. P. bau001. <https://doi.org/10.1093/database/bau001>
21. Hallin S., Jones C. M., Schloter M., Philippot L. Relationship between n-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment // *ISME J.* 2009. V. 53. P. 597–605. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.128>
22. Harayama S., Reik M. Bacterial aromatic ring cleavage enzymes are classified into two different gene families // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 15328–15333. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)84830-5/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)84830-5/pdf)
23. Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F. et al. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site // *J. Microbiol. Methods*. 2006. V. 64. P. 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.018>

24. Henry S., Baudouin E., López-Gutiérrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR // J. Microbiol. Methods. 2004. V. 59. P. 327–335.
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2004.07.002>
25. Hiraiishi A., Ueda Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas-rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplaneselegans* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 665–673.
<https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-665>
26. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. 109–114.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
27. Kaprelyants A.S., Mukamolova G. V., Davey H.M., Kell D.B. Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 4. P. 1311–1316.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1311-1316.1996>
28. Kok M., Oldenhuis R., van der Linden M. P. G., Raatjes P., Kingma J., van Lelyveld P.H. The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene, sequence and expression // J. Biological Chem. 1989. V. 264. P. 5435–5441.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83564-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83564-5)
29. Langille M., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J., Clemente J., Burkepile D. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. № 9. P. 814–821.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
30. Manucharova N.A., Ksenofontova N.A., Belov A.A., Kamenskiy N.N., Arzamazova A.V., Zenova G.M., Kinzhaev R.R., Trofimov S.Y., Stepanov A.L. Prokaryotic component of oil-contaminated oligotrophic peat soil under different levels of mineral nutrition: biomass, diversity, and activity // Eurasian Soil Science. 2021. V. 54. № 1. P. 89–97.
<https://doi.org/10.31857/s0032180x2101010x>
31. Markowitz V.M., Chen I.-M.A., Palaniappan K., Chu K., Szeto E., Grechkin Y., Ratner A. et al. IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. D115–22.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
32. McIlroy S.J., Nielsen P.H. The Prokaryotes / Eds E. Rosenberg et al. Berlin: Springer, 2014. P. 863–889.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9>
33. Nichols D., Lewis K., Orjala J., Mo S., Ortenberg R., O'Connor P., Zhao C., Vouros P., Kaerberlein T., Epstein S.S. Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow *in vitro* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 15. P. 496.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00393-08>
34. Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum* // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. № 4. P. 992–999.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x>
35. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for large alignments // PLoS One. 2010. V. 5. № 3. P. e9490.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
36. Rotthauwe J., Witzel K. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 4704–4712.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>
37. Somanadhan B., Kotturi S.R., Yan Leong C., Glover R.P., Huang Y., Flotow H., Buss A.D., Lear M.J., Butler M.S. Isolation and synthesis of falcitidin, a novel myxobacterial-derived acyltetrapeptide with activity against the malaria target falcipain-2 // J. Antibiot. (Tokyo). 2013. V. 66. № 5. P. 259–264.
<https://doi.org/10.1038/ja.2012.123>
38. Su X., Chen X., Hu J., Shen C., Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. № 12. P. 2213–2218.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1390-5>
39. Takashi Itoh, Kaoru Yamanoi, Takuji Kudo, Moriya Ohkuma, Tomonori Takashina. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field // Int. J. Systematic Evolutionary Microbiol. 2011. V. 61. P. 1281–1285.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.023044-0>
40. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
41. Whyte L.G., Schultz A., van Beiden J.B., Luz A.P., Pellizzari V., Labbé D., Greer C.W. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 41. P. 141–150.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00975.x>

Biotechnological Potential of Hydrolytic Prokaryotic Component in Soils

N. A. Manucharova^{1, *}, M. A. Kovalenko¹, M. G. Alekseeva¹, A. D. Babenko¹, and A. L. Stepanov¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: manucharova@mail.ru

The phylogenetic and functional diversity of a prokaryotic complex with biotechnological potential (carrying out the destruction of biopolymers, hydrocarbons; capable of synthesizing secondary metabolites; nitrogen fixation process) in soil and associated ecosystems has been studied. In order to identify the specifics of the development of metabolically active prokaryotes with biotechnological potential, the patterns of their distribution and the dependence of functional activity on the main environmental factors have been established.

The study used molecular biological and bioinformatic approaches. The range of samples studied included modern soils (Volgograd, Tula, Moscow regions, Siberia and the Northern part of Central Kamchatka), relict habitats (Volgograd Region and Central Kamchatka) and permafrost soils of Antarctica (King George Island). The impact of anthropogenic and abiogenic loads on the development of the prokaryotic community was considered. In soils exposed to anthropogenic or abiogenic loads, along with a decrease in the diversity and abundance of prokaryotes, an increase in the number of genes marking the ability of a community to biodegrade xenobiotics, as well as genes encoding nitrogen transformations and the level of metabolism of co-factors and vitamins was found. The bacterial complex is capable of nitrification with high oil contamination of the soil, and its role also increases in the lower layers of the soil profile. Archaea play a leading role in the nitrification process in undisturbed soils. The revealed patterns indicate a high metabolic potential of the prokaryotic component of the objects under consideration and open up opportunities for biotechnological use of strains isolated from relict habitats.

Keywords: functional genes, hydrolytics, oil, nitrogen cycle, bacteria, archaea

ЭКОЛОГИЯ
ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 631.461.74

ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЛЕЙ АММОНИЯ
И ЛАНТАНА НА ОКИСЛЕНИЕ МЕТАНА И СОСТАВ
МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЕ

© 2023 г. И. К. Кравченко^а, * (ORCID: 0000-0002-9563-7025), Л. Р. Сизов^б, Л. В. Лысак^с

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ биотехнологии РАН,
Ленинский пр-т, 33, стр. 2, Москва, 119991 Россия

^бФедеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН,
пр-т акад. Семенова, 1, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

^сМГУ им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Поступила в редакцию 21.10.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Одним из перспективных подходов в решении вопросов устойчивости экосистем к стрессовым воздействиям является оценка реакции микробных сообществ почв, осуществляющих важные эколого-биосферные функции, на природные или антропогенные воздействия. В модельном эксперименте с дерново-подзолистой почвой (Eutric Albic Retisol (Abruptic, Loamic)) установлено ингибирующее действие аммония и стимулирующее действие лантана на окисление метана микроорганизмами почвы. Внесение аммония и лантана снижало таксономическое разнообразие бактериального сообщества почвы и изменяло его структуру: уменьшалось относительное содержание грамположительных бактерий филумов Actinobacteriota и Bacillota, тогда как доля грамотрицательных бактерий филума Pseudomonadota возрастала. Внесение лантана на несколько порядков увеличивает относительное содержание в сообществе метанотрофов рода *Methylobacter* и облигатных метилотрофов рода *Methylothera*. Результаты работы могут быть использованы для разработки подходов регуляции активности почвенного метанового фильтра и сопутствующей микробиоты.

Ключевые слова: почвенные микробные сообщества, метановый цикл, метаболическая активность, метанотрофы

DOI: 10.31857/S0032180X22601384, **EDN:** IFOLQM

ВВЕДЕНИЕ

Метан является важнейшим парниковым газом, хотя его содержание в атмосфере составляет <0.02 об. %, вклад в современное глобальное потепление оценивается в 15% [30]. Единственным известным биологическим механизмом регуляции его содержания в атмосфере Земли является окисление микробными сообществами аэробных почв. Согласно современным расчетам, оно составляет 22.4 Тг/год, из которых половина приходится на лесные почвы умеренной зоны [18]. Поэтому любые изменения интенсивности поглощения атмосферного метана лесными почвами в результате поступления азотных соединений, внесения минеральных удобрений, перевода в сельскохозяйственное использование имеют глобальные последствия. Более 20 лет проводится активное изучение различных аспектов биологического поглощения метана в почвах, результаты этих работ обобщены в ряде обзоров [14, 15, 31].

Однако ни в одной из этих публикаций не приводятся данные о вкладе почв России в этот важнейший процесс глобального метанового цикла. Регулярные исследования поглощения атмосферного метана почвами России обобщены в работе [25].

Агроэкологические системы, ставшие неотъемлемой составной частью современной биотехносферы, испытывают постоянные техногенные воздействия, подвергаются влиянию различных загрязнений локального, регионального и глобального характера. Почвы и их микробные сообщества находятся под постоянным воздействием глобальных изменений климата, одним из последствий которого является увеличение продолжительности и интенсивности процессов иссушения значительных площадей [19]. Кроме того, они подвергаются влиянию возрастающего загрязнения азотными соединениями, поступающими с атмосферными осадками, удобрениями, из выбросов предприятий и автотранспорта, а

также таких стрессовых факторов, как повышение температуры, засоление, уплотнение почвы [27]. Микробные сообщества почв отвечают за осуществление важнейших экосистемных процессов, поэтому наблюдается постоянно растущий интерес к изучению их устойчивости и восстановления состава и метаболической активности после стрессового воздействия [19].

Несмотря на интенсивные исследования, до сих пор нет ясности в вопросах: какие микроорганизмы отвечают за окисление метана атмосферы, как изменяется их активность и разнообразие при антропогенном воздействии, являются эти изменения обратимыми и существуют способы регуляции микробных процессов цикла метана. До недавнего времени считалось, что окислять метан в аэробных условиях могут только представители двух хорошо филогенетически очерченных групп протеобактерий, относящихся к семействам *Methylocystaceae* и *Methylococcaceae*. В последнее десятилетие произошли значительные изменения в представлениях о таксономическом разнообразии аэробных метанотрофов. Согласно современным представлениям, аэробные метанотрофы относятся к филумам *Gamma*proteobacteria (Type I), *Alphaproteobacteria* (Type II) и *Verrucomicrobia* [24]. Список метанотрофных протеобактерий пополняют представителями *Beijerinckiaceae* [17, 35]. Установлена способность к метаноокислению у нитчатых *Gamma*proteobacteria *Crenothrix polyspora* [33] и *Clonothrix fusca* [34].

Важнейшим и до конца не ясным остается вопрос о механизмах и факторах, которые определяют направленность и величину потоков метана между почвой и атмосферой. Поток метана является результирующей процессов метаногенеза и метанотрофии, причем в аэробных почвах доминирует последний процесс [13]. В проведенных ранее исследованиях, выполненных на объектах серой лесной почвы, установлена тесная коррелятивная связь величины потока метана с такими физико-химическими факторами, как температура и влажность почвы, содержание минеральных соединений азота и легкогидролизуемых фракций почвенного органического вещества, величины порового пространства и среднего размера пор [4]. В настоящее время существует большое количество публикаций, демонстрирующих снижение метанооксиляющей активности различных почв естественных экосистем после их перевода в сельскохозяйственное использование [23, 29]. Таким образом, активность и разнообразие почвенных метанотрофных бактерий могут быть использованы как индикаторные показатели влияния антропогенных воздействий на экосистему.

Влияние соединений азота на окисление метана почвенными микроорганизмами широко обсуждается, однако причины этого явления до

конца не ясны. Внесение азотных соединений может ингибировать, стимулировать или не оказывать влияния на процесс окисления метана [11]. Внесение небольших количеств аммонийного азота, как правило, стимулирует окисление метана, в то время как высокие дозы аммонийного азота ингибируют [28].

Влияние на окисление метана иных, чем азот минеральных элементов, изучено очень слабо. В последнее десятилетие большое внимание уделяется лантаноидам в связи с их стимулирующим воздействием на рост растений [3] и участием в метаболизме миклотрофов [32]. В процессе почвообразования и разрушения литогенных минералов, а также при применении фосфоритной муки в качестве удобрения, лантаноиды поступают в почву, но находятся в недоступной форме в составе минеральной фазы и комплексов с гумусовыми кислотами, в то время как подвижные формы лантаноидов вымываются из почвы [3]. Для увеличения урожайности и качества сельскохозяйственной продукции в Китае применяют микродоброения, содержащие соли лантаноидов, что приводит к изменениям содержания микробной биомассы и ферментативной активности почвы [21]. В России исследования в этом направлении проводятся в Бурятии, показано, что внесение солей лантана в почву стимулирует микробные процессы цикла азота [8].

Цель работы – изучить влияние солей аммония и лантана на активность окисления метана и состав микробных сообществ дерново-подзолистой почвы в модельных условиях лабораторного инкубационного эксперимента.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика почвы и условия проведения лабораторного эксперимента. Для модельных опытов с микрокосмами использовали постагрогенную почву залежного разнотравно-злакового луга вблизи Пошехонской птицефабрики, Ярославская область (58°50'99" N, 39°14'23" E). Почва характеризовалась как дерново-подзолистая на моренных отложениях согласно классификации почв России [2] или *Eutric Albic Retisols* (*Abruptic, Loamic*) по международной реферативной базе почвенных ресурсов (WRB [22]). Почву более 15 лет использовали для выращивания кормовой вико-овсяной смеси с применением высоких доз куриного помета и суперфосфата, последние 6 лет – залежь.

Образцы почвы отбирали 02 июня 2020 г. в пяти точках из верхнего 0–20 см слоя. Смешанный почвенный образец просеивали через сито 2 мм, удаляя фрагменты растительных остатков и камней, и использовали для закладки лабораторного эксперимента и оценки базовых микробиологи-

Таблица 1. Характеристика дерново-подзолистой почвы, использованной для проведения инкубационных экспериментов. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 5$)

Параметр	Значение
Гранулометрический состав, содержание фракции, %	
0.5–0.25 мм	5.75
0.25–0.05 мм	24.30
0.05–0.01 мм	27.11
<0.01 мм	42.84
pH _{H₂O}	5.4 \pm 0.1
Азот общий, %	0.27 \pm 0.02
Углерод общий, %	6.17 \pm 0.58
C : N	22.9
C _{орг} , %	4.87 \pm 0.7
N–NH ₄ ⁺ , мг/100г	0.64 \pm 0.01
N–NO ₃ ⁻ , мг/100г	26.1 \pm 0.3
P ₂ O ₅ , мг/100г	5.63 \pm 0.09
K ₂ O, мг/100г	10.10 \pm 0.01
Ca ²⁺ , ммоль/100 г	22.4 \pm 0.141
Mg ²⁺ , ммоль/100 г	4.601 \pm 0.014
Базальное дыхание, мкг C–CO ₂ /(г ч)	0.56 \pm 0.07
Микробная биомасса, мкг C/г	1352 \pm 65
Метаболический коэффициент (q CO ₂)	1.59 \pm 0.31
Количество бактерий (микроскопия), кл./г	12.8 \pm 1.3 $\times 10^{10}$
Численность бактерий сапротрофного блока, КОЕ/г	5.5 \pm 0.9 $\times 10^7$

ческих параметров почвы. Оценку базального и субстрат индуцированного дыхания почвы, а также количества почвенных микроорганизмов проводили, как описано ранее [1]. Часть почвы высушивали на воздухе и использовали для определения физико-химических характеристик почвы в Центре коллективного пользования “Физико-химические методы исследования почв и экосистем” ИФХиБПП РАН. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Модельные опыты с почвенными микрокосмами. Исходную почву (вариант К) использовали для создания микрокосмов, каждый из которых представлял собой 10 г почвы естественной влажности, помещенной в стеклянный флакон объемом 100 мл. Изучили следующие варианты эксперимента: М – почва без добавок; ML1 – внесение водного раствора хлорида лантана (5 мкг La³⁺/г); MN – внесение водного раствора хлорида аммония (100 мкг NH₄⁺–N/г); MNL1 – внесение водного раствора хлорида аммония (100 мкг NH₄⁺–N/г) и водного раствора хлорида лантана (5 мкг La³⁺/г).

Вариант ML2 – это 5 флаконов для газовых анализов варианта ML1, которые дополнительно инкубировали в течение 1 мес.

Для каждого варианта закладывали по 35 флаконов. Пять из них извлекали из эксикаторов, принудительно проветривали, измеряли потенциальное окисление метана и после измерений возвращали в эксикатор. В течение 1 мес. анализировали 12 точек: 0, 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 15, 20, 25 и 30 сут после начала эксперимента. В те же дни (0–15, 30 сут) 3 флакона изымали деструктивно для анализа pH и азотных соединений. Экстракцию тотальной ДНК проводили в начале эксперимента (К), через 1 мес. инкубации (варианты М, ML1, MN, MNL1) и через 2 мес. (ML2).

Влажность почвы К при закладке эксперимента составляла 23 мас. %. Растворы солей вносили в начале эксперимента в объеме 0.5 мл/10 г почвы, в вариант М добавляли дистиллированную воду. Флаконы инкубировали в эксикаторах с метановоздушной смесью 10 : 90 по объему при 25°C. Газовую смесь заменяли раз в неделю, одновременно контролируя влажность почвы весовым мето-

дом, при необходимости компенсируя потери добавлением дистиллированной воды.

Измерение скорости окисления метана и дыхательной активности почвы. Флаконы с почвой герметично закрывали резиновыми пробками и добавляли в газовую фазу метан до концентрации около 200 ppm. Реальную величину концентрации определяли на газовом хроматографе (значение C_0). Флаконы инкубировали при 25°C в течение 24 ч, после чего повторно определяли концентрацию метана (значение C_1) и определяли разницу в содержании метана (ppm), исходя из которой считали количество окисленного метана A (мг CH_4) по формуле:

$$A = \frac{(C_1 - C_0) M_{\text{CH}_4} V_{\text{фл}}}{V_m \times 1000},$$

где C_0 и C_1 – концентрации газов до и после экспозиции, ppm; M_{CH_4} – молярная масса метана (16 г/моль); $V_{\text{фл}}$ – объем флакона, л; V_m – молярный объем газа при нормальных условиях (22.4 л/моль).

Скорость окисления метана v (мкг CH_4 /(г почвы ч)) рассчитывали по формуле:

$$v = \frac{A \times 1000}{m_n t},$$

где A – количество окисленного метана, мг CH_4 ; m_n – масса воздушно-сухой навески почвы в флаконе; t – время экспозиции, ч.

Измерение концентрации CH_4 и CO_2 в газовой фазе микрокосмов проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.1 (Хроматэк, Россия), снабженном пламенно-ионизационным детектором на колонке размером 3.0 м × 0.2 см, заполненной HayeSep N. Температура колонки составляла 40°C, детектора 200°C. Аргон, служивший в качестве газа-носителя, подавали со скоростью 25 мл/мин.

Определение концентрации ионов водорода и нитрат-ионов. Концентрацию ионов водорода в почвенной суспензии (почва : вода 1 : 2.5) измеряли методом прямой потенциометрии на приборе pH-Meter-pH410 компании “Аквилон” с комбинированным pH-электродом ЭСК-10601/7. Измерение активности нитрат-иона проводили в той же суспензии на иономере рХ-150.1МИ с помощью ионоселективного нитратного электрода ЭЛИС-121NO3 и хлорсеребряного электрода сравнения ЭСР-10101, насыщенного раствором KCl. Значение показателя активности нитрат-ионов ($p\text{NO}_3^-$) пересчитывали в массовую долю азота нитратов в почве (X , мг/кг) по формуле:

$$X = \frac{10^{-p\text{NO}_3^-} M V \times 1000}{m_n},$$

где $p\text{NO}_3^-$ – молярная концентрация нитрата, моль/л; M – молярная масса N– NO_3 (14 г/моль); V – объем экстрагирующей жидкости, мл; m_n – масса воздушно-сухой навески почвы, взятой для анализа, г.

Выделение ДНК. Секвенирование и обработка данных. ДНК выделяли из образцов почвы массой 0.25 г с помощью коммерческого набора реактивов MO BIO Power Soil DNA Isolation Kit (QIAGEN) согласно протоколу производителя.

Высокопроизводительное секвенирование 16S рРНК проводили при помощи системы Illumina MiSeq в ООО Биоспарк, Троицк. Подготовку и секвенирование ДНК-библиотек для гипервариабельного V3–V4 участка гена 16S рРНК и обработку данных проводили как было описано нами ранее [5].

С помощью программных пакетов QIIME 2 определяли индексы разнообразия [12], рассчитанные при объединении нуклеотидных последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с уровнем сходства в 97%. Альфа-разнообразие оценивали по индексу Шеннона, выровненность ОТЕ в сообществе по индексу Пиелу. В качестве показателя филогенетического разнообразия использовали индекс Фейта PD [6].

Статистическая обработка данных. Все измерения выполняли не менее чем в трех повторностях. Для каждой выборки считали среднее и стандартное отклонение в программном продукте Excel 2013 (Microsoft Corp.). Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для парных сравнений использовали критерий Стьюдента (t-test), статистически значимыми считали критерии при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние солей аммония и лантана на скорость окисления метана. Изменение скорости окисления метана в почве за время инкубации представлено на рис. 1. В первые 3 сут в вариантах с внесением соли аммония (MN) скорость метаноокисления снижалась с 0.024 до 0.006 мкг CH_4 /(г ч), в то время как в почве без внесения аммония (M) – до 0.015 мкг CH_4 /(г ч) (t-test, $p = 0.01$). Уменьшение метанотрофной активности в почве при внесении солей аммония было отмечено в ряде исследований [4, 28]. Данный эффект можно объяснить конкурентным механизмом ингибирования, при котором метанмонооксигеназа окисляет аммоний вместо метана, и накоплением токсичных продуктов окисления аммония. Через 10 сут в обоих вариантах скорость метаноокисления составляла 0.008 мкг CH_4 /(г ч). К концу периода инкубации (30 сут) величина метаноокисляющей активности варианта MN составляла 0.01 мкг CH_4 /(г ч). Эти

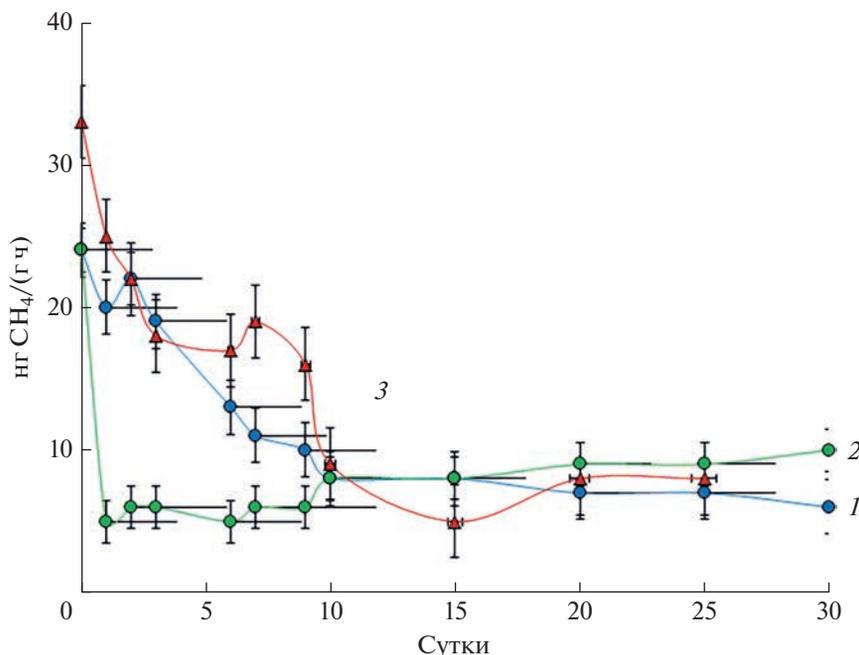


Рис. 1. Скорость окисления метана в дерново-подзолистой почве без внесения солей, М (1); с внесением сульфата аммония, MN (2); с внесением хлорида лантана, ML1 (3). Представлены средние значения величин и стандартные отклонения.

различия были небольшими в абсолютном выражении, но значимыми (t-test, $p = 0.03$).

Внесение хлорида лантана (ML1) положительно повлияло на потребление метана. Уже через сутки скорость окисления метана в почве стала выше, чем в контроле, и составила $0.033 \text{ CH}_4/(\text{г ч})$ (t-test, $p = 0.01$). Эта тенденция сохранялась в течение 20 сут, и максимальный эффект, двукратное превышение, был отмечен на 10 сут. Через 25 сут достоверных отличий от контроля не зафиксировано.

Влияние солей лантана и аммония на накопление нитратов и кислотность почвы. Результаты изменения содержания нитрат-ионов в почвенном растворе и актуальной почвенной кислотности представлены на рис. 2. В вариантах эксперимента с внесением соли аммония (MN и MNL1) наблюдается снижение его содержания и увеличение содержания нитрата. Добавление соли лантана (MNL1) положительно повлияло на процесс потенциальной нитрификации, к концу инкубации содержание нитрат-ионов было на 24% больше, чем в варианте без лантана MN, и составило 155 и $125 \text{ мкг N-NO}_3^-/\text{г}$ соответственно. Интересно отметить, что в некоторых образцах количество нитратного азота превысило внесенный аммонийный азот. Возможно, это проявление затравочного эффекта, при котором наличие легкодоступного для окисления аммония позволило микроорга-

низмам использовать азот органического вещества почвы.

Исследуемая дерново-подзолистая почва (К) имела умеренно кислую реакцию среды pH 5.4 и высокое содержание нитратов. После недели инкубации наблюдали значимое ($p = 0.01$), но в абсолютных выражениях небольшое повышение кислотности почвы в образцах MN и MNL1 с внесением аммония (рис. 2b) до pH 4.8–4.9, так как сульфат аммония и хлорид лантана – это физиологически кислые соли. Благодаря буферным свойствам почвы уже через 20 сут уровень кислотности практически вернулся к исходному значению.

Таким образом, хлорид лантана стимулирует процессы окисления аммония и накопления нитратов, что положительно влияет на окисление метана. Однако нужно учитывать, что при внесении хлорида лантана возможно подкисление почвы, которое будет снижать интенсивность процессов нитрификации на срок, зависящий от буферных свойств почвы.

Влияние солей аммония и лантана на таксономическую структуру и разнообразие бактериального сообщества. В исходной почве (К) было обнаружено два доминантных филума: Pseudomonadota (35% от числа всех последовательностей) и Acidobacterota (28%), а также значительное содержание Bacteroidota (18%) (рис. 3). Значительную часть составляли представители филума Verrucomicro-

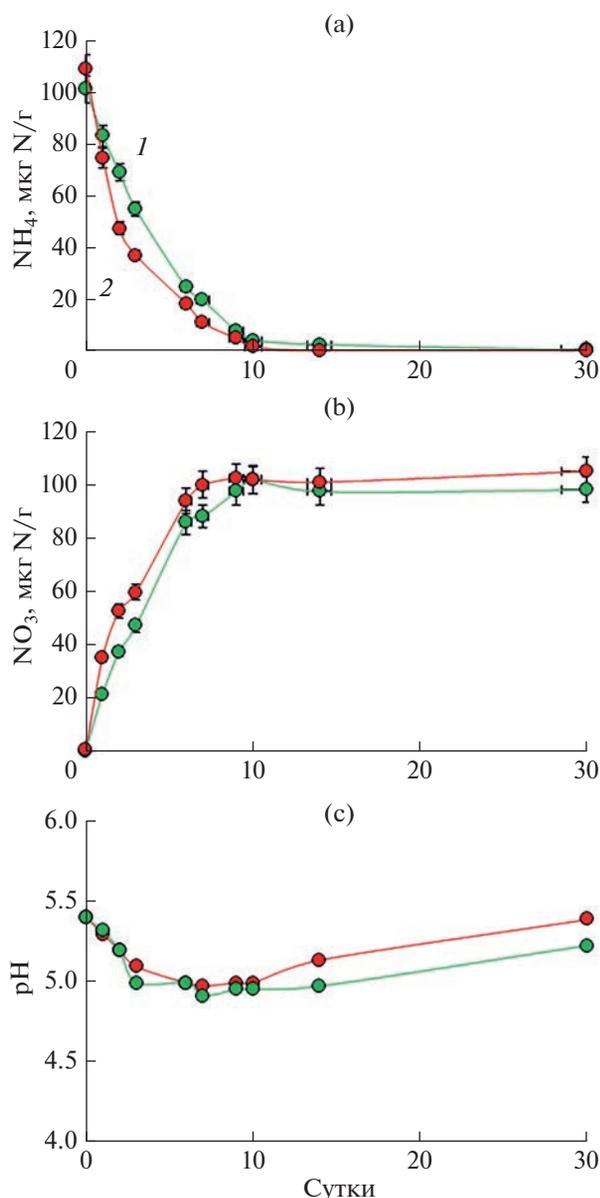


Рис. 2. Окисление аммония (а), накопление нитрата (б) и изменение pH (с) в дерново-подзолистой почве с внесением сульфата аммония, MN (1); с внесением сульфата аммония и хлорида лантана, MNL1 (2). Представлены средние значения величин и стандартные отклонения.

biota (7%), а также филумов Actinomycetota, Chloroflexota, Gemmatimonadota и Nitrospirota (по 2% каждый). В минорном компоненте с относительным содержанием <1% обнаружены Armatimonadota, Chlorobiota, Cyanobacteria, Elusimicrobiota, Fibrobacterota, Bacillota, Ignavibacteriota, Latescibacteria, Parcubacteria, Planctomycetota, Saccharibacteria, Spirochaetota и Berkelbacteria.

Таксономическая структура сообщества значительно изменилась при инкубировании образ-

цов в воздушно-метановой атмосфере. Как тенденция отмечено увеличение доли филума Pseudomonadota особенно в вариантах с внесением солей. Так, в варианте М после 1 мес. инкубации доля Pseudomonadota возросла до 48%, и значительно увеличилась представленность филумов грамположительных бактерий Actinomycetota (20%) и Bacillota (8%). Кроме того, по сравнению с исходной почвой выросло относительное содержание филумов Chloroflexota (5%) и Gemmatimonadota (3%), а филумов Acidobacterota (7%), Bacteroidota (5%) и Verrucomicrobiota (2%) значительно уменьшилась.

В вариантах с внесением солей наблюдали дальнейшее увеличение доли Pseudomonadota в сообществе: 55% в варианте ML1, 64% – ML2 и 66% – MN. Сохранялась высокая представленность филумов Acidobacterota (9–13%) и Bacteroidota (8–11%) соответственно. По сравнению с почвой М значительно уменьшился вклад в сообщество, вносимый бактериями филумов Actinomycetota (4–5%) и Bacillota (2–4%), а также Chloroflexota (1%). В то же время выросла доля представителей филумов Gemmatimonadota (5–7%).

Для определения влияния солей аммония и лантана на альфа-разнообразие бактериального сообщества дерново-подзолистой почвы сравнили сообщества по количеству филумов и ОТЕ, определенных до рода.

В сообществе почвы М после месяца инкубации было определено 290 родов из 16 филумов, что значительно меньше, чем было в исходной почве К (421 род из 21 филума). Внесение хлорида лантана еще больше сократило разнообразие: через 1 мес. после внесения было определено только 203 рода из 16 филумов, а через 2 мес. – 218 родов из 17 филумов. Негативное воздействие соли лантана на разнообразие подтверждается значениями индексов разнообразия Шеннона (4.0–4.2) и PD (3.4–3.8), которые были значительно меньше таковых в контрольной почве (индекс Шеннона 4.9, PD 5.6). Кроме того, снизилось значение выровненности таксонов в сообществе с 0.89 до 0.86 (табл. 2).

При инкубировании с сульфатом аммония разнообразие снизилось, но в меньшей мере. В бактериальном сообществе было определено 228 родов из 17 филумов, разнообразие по индексу Шеннона (4.8) было практически на том же уровне, что в контроле. Значение показателя выровненности увеличилось до 0.93. При этом индекс филогенетического разнообразия Фейта снизился с 5.6 до 4.2, что говорит о том, что большее количество таксонов стало находиться относительно недалеко друг от друга на филогенетическом древе. По-видимому, при этом нарушается устоявшееся сочетание экологических ниш и вырастает

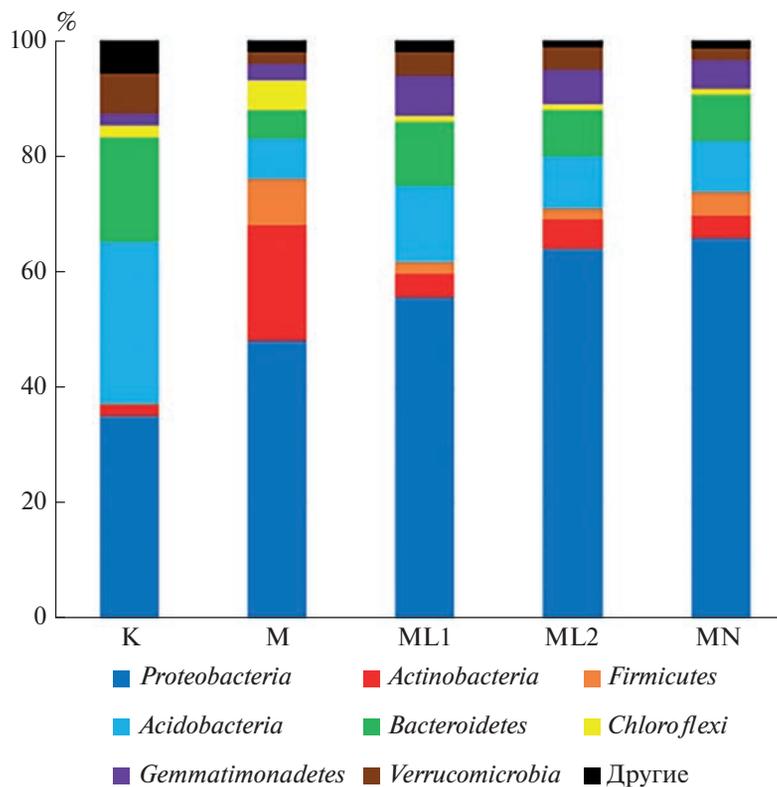


Рис. 3. Таксономическая структура бактериального сообщества дерново-подзолистой почвы на уровне филумов (% от общего числа последовательностей в образце). Условные обозначения здесь и далее: К – исходная почва; М – инкубация с метаном, 1 мес.; ML1 – инкубация с метаном и лантаном 1 мес.; ML2 – инкубация с метаном и лантаном 2 мес.; MN – инкубация с аммонием, 1 мес.

относительное обилие специфических групп микроорганизмов.

Основные роды бактерий (относительное содержание >1%) сообщества дерново-подзолистой почвы до и после инкубации представлены в табл. 3. Относительное обилие протеобактерий увеличилось после месяца инкубации почвы в контрольных условиях за счет представителей класса Alphaproteobacteria, обилие которых выросло от 12 до 31%, в первую очередь за счет рода *Sphingomonas* (доля выросла от 4 до 15%). Бактерии рода *Sphingomonas* принадлежат более чем к ста видам, являются аэробными гетеротрофами и выделяются из воздуха, почвы, водных экосистем, донных отло-

жений, ризосферы и растений [10]. Большое таксономическое и экофизиологическое разнообразие позволяет бактериями *Sphingomonas* доминировать во многих местообитаниях и эффективно приспосабливаться к изменяющимся условиям среды. Другие представители Alphaproteobacteria, содержание которых значительно увеличилось при инкубации, принадлежат к родам *Varibacter* (рост от 0.3 до 1%) и *Bradyrhizobium* (от 0.5 до 1%). Относительное обилие представителей классов Beta- и Gammaproteobacteria не изменилось. В пределах этих двух классов преобладающими родами являлись *Massilia* (3%) и *Lysobacter* (5%), в то время как в исходной почве наиболее представлены были бактерии рода *Acidibacter* (1%).

Таблица 2. Альфа-разнообразие бактериального сообщества дерново-подзолистой почвы

Параметр	Вариант инкубационного эксперимента бактерии			
	М	ML1	ML2	MN
Количество определенных родов (филумов)	290 (16)	203 (16)	218 (17)	228 (17)
Индекс Пиелу	0.89	0.86	0.91	0.93
Индекс Шеннона	4.9	4.0	4.2	4.8
Индекс PD	5.6	3.8	3.4	4.2

Таблица 3. Изменения в составе бактериальных сообществ дерново-подзолистой почвы лабораторных экспериментов на уровне рода, относительное содержание, %*

Филум	Вариант инкубационного эксперимента бактерии				
	К	М	ML1	ML2	MN
Pseudomonadota	<i>Sphingomonas</i> (4%) <i>Geobacter</i> (3%) <i>Acidibacter</i> (1%)	<i>Sphingomonas</i> (15%) <i>Variibacter</i> (1%) <i>Bradyrhizobium</i> (1%) <i>Massilia</i> (3%) <i>Lysobacter</i> (5%)	<i>Sphingomonas</i> (13%) <i>Phenylobacterium</i> (1%) <i>Methylothera</i> (10%) <i>Methylobacter</i> (4%)	<i>Sphingomonas</i> (6) <i>Methylothera</i> (19%) <i>Methylobacter</i> (7%) <i>Hyphomicrobium</i> (1%)	<i>Sphingomonas</i> (15%) <i>Variibacter</i> (1%) <i>Bradyrhizobium</i> (1%) <i>Massilia</i> (3%) <i>Lysobacter</i> (5%)
Acidobacteriota	<i>Cand. Solibacter</i> (5%) <i>Bryobacter</i> (2%)	<i>Cand. Solibacter</i> (1%), <i>Bryobacter</i> (1%)	<i>Cand. Solibacter</i> (2%) <i>Bryobacter</i> (1%)	<i>Cand. Solibacter</i> (1%)	<i>Cand. Solibacter</i> (1%) <i>Bryobacter</i> (1%)
Actinobacteriota		<i>Streptomyces</i> (2%) <i>Blastococcus</i> (1%)			<i>Streptomyces</i> (2%) <i>Blastococcus</i> (1%)
Bacillota		<i>Bacillus</i> (5%)			<i>Paenibacillus</i> (1%)
Gemmatimonadota	<i>Gemmatimonas</i> (2%)	<i>Gemmatimonas</i> (2%)	<i>Gemmatimonas</i> (2%)	<i>Gemmatimonas</i> (2%)	<i>Gemmatimonas</i> (2%)
Bacteroidota	<i>Pedobacter</i> (1%)		<i>Flavisolibacter</i> (1%)	<i>Flavisolibacter</i> (1%)	
Nitrospirata	<i>Nitrospira</i> (2%)				

* Бактерии с относительным содержанием в сообществе не менее 1%.

Значительно снизилась доля в сообществе представителей класса Deltaproteobacteria, в особенности рода *Geobacter* (от 3 до 0.02%). Бактерии данного рода способны восстанавливать железо и марганец в анаэробных условиях [9], и снижение их относительного обилия можно объяснить возросшей конкуренцией в почве за доступное органическое вещество.

В пределах филума Acidobacteriota существенно уменьшилась доля представителей класса Solibacteres (от 7 до 2%), особенно родов *Candidatus Solibacter* (с 5 до 1%) и *Bryobacter* (от 2 до 1%). В филуме Bacteroidota от 12 до 5% уменьшилось относительное содержание представителей класса Sphingobacteriia, род *Pedobacter* (от 1 до 0.1%). На порядок уменьшилось относительное содержание представителей рода *Nitrospira* из филума Nitrospirae, от 2 до 0.2%. Эти облигатные хемолитоавтотрофы способны осуществлять полное окисление аммония до нитрата, что отличает их от других нитрифицирующих бактерий [16]. Вклад, вносимый в сообщество представителями классов Actinobacteria и Bacilli, вырос до 10 и 7% соответственно. Для сравнения в исходной почве эти два класса суммарно составляли лишь 0.6%. Основные роды грамположительных бактерий: *Bacillus* (5%), *Streptomyces* (2%) и *Blastococcus* (1%). Некоторое преимущество при инкубации получили представители рода *Gemmatimonas* из филума Gemmatimonadota, содержание которых возросло с 0.5 до 2%.

После внесения хлорида лантана (ML1) в таксономической структуре и разнообразии бактериального сообщества произошли значительные

изменения. Представители класса Alphaproteobacteria уже не доминировали и были только третьими по относительному обилию: 22% через 1 мес. и 15% через 2 мес. Вклад представителей остальных классов протеобактерий, напротив, значительно увеличился. Так, доля Betaproteobacteria составила 18 и 28%, а Gammaproteobacteria — 11 и 18% через 1 и 2 мес. соответственно. Доля представителей Deltaproteobacteria составила 3–4%. Примечательно, что на уровне родов доминировали метило- и метанотрофные бактерии, что не характерно для вариантов без внесения лантана, несмотря на одинаково высокую концентрацию метана. Возможно, представители этих родов не могли доминировать в бактериальном сообществе в условиях ограниченного содержания в почве кальция и лантана, элементов, необходимых для активности метанолдегидрогеназ и ассимиляции метана. Вклад, вносимый представителями рода *Sphingomonas*, уменьшился от 15% в контрольном варианте до 13% при внесении лантана за 1 мес. и до 6% за 2 мес. Из других филумов существенное относительное обилие имели роды *Candidatus Solibacter* (1–2%) и *Bryobacter* (0.6–1%) из класса Solibacteres; *Flavisolibacter* (1%) из класса Chitinophagia; *Gemmatimonas* (4–5%) из класса Gemmatimonadetes.

Влияние солей аммония и лантана на состав сообщества метанотрофных и нитрифицирующих бактерий. Анализ таксономического состава микробных сообществ показал доминирование метанотрофных бактерий в вариантах с внесением солей лантана. На рис. 4 представлены данные о представленности в микробных сообществах ме-

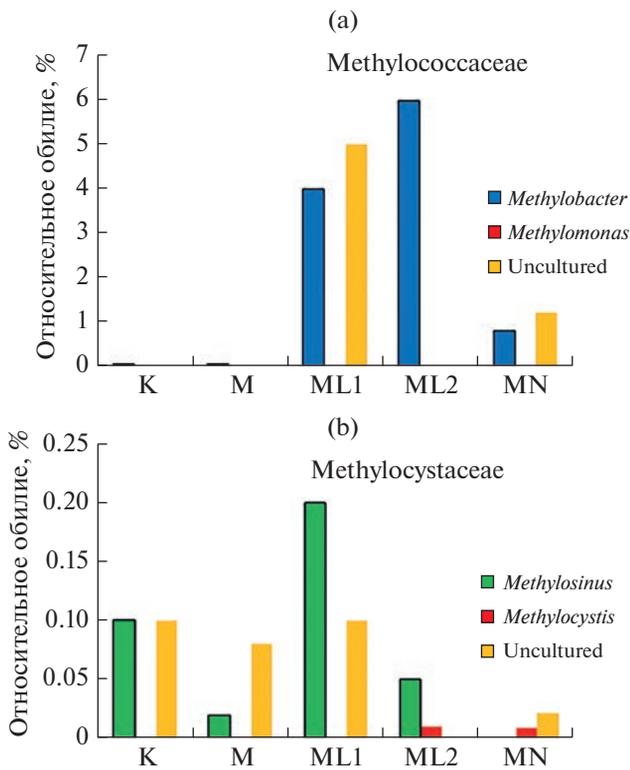


Рис. 4. Изменения в составе метанотрофов семейства Methylococcaceae (a) и Methylocystaceae (b) в образцах почвы инкубационного эксперимента после инкубации в течение месяца.

танотрофных бактерий, относящихся к Methylococcaceae (4a) и Methylocystaceae (4b). Внесение солей лантана приводило к многократному возрастанию количества метанотрофов рода *Methylobacter* из класса Gammaproteobacteria, которые составляли 4% через 1 мес. инкубации и 6% через 2 мес. Одновременно возрастала представленность облигатного метилотрофа рода *Methylotenera* – 10, 19% через 1 и 2 мес. соответственно. Это может быть объяснено наличием у *Methylotenera* только одной формы метанолдегидрогеназы, ХохF-MDH, содержащей в активном центре лантан [32]. Созданные в условиях лабораторных экспериментов высокое содержание в почве лантана и высокое содержание метана в газовой фазе, вероятно, создают селективные условия для развития лантанозависимых метанотрофов.

Исходная почва К характеризуется высоким содержанием хемолитотрофных нитрифицирующих бактерий как первой, так и второй фазы нитрификации (рис. 5a). В составе аммонийоксиляющих бактерий обнаружены представители рода *Nitrosospira*, однако их относительное обилие очень мало (0.09%), а остальная часть (2.91%) представлена некультивируемыми представителями семейства Nitrosomonadaceae. Внесение со-

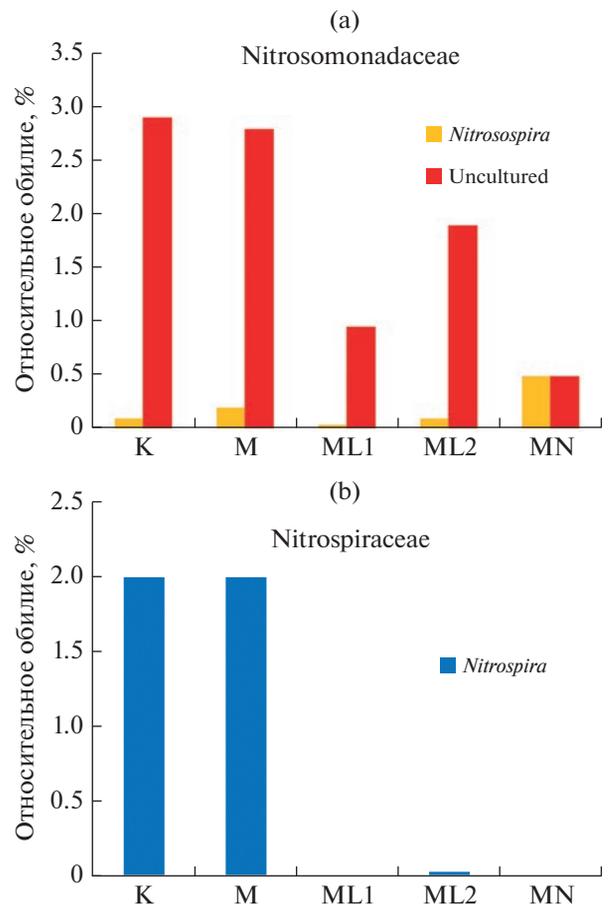


Рис. 5. Изменения в составе нитрификаторов семейства Nitrosomonadaceae (a) и Nitrospiraceae (b) в образцах почвы инкубационного эксперимента после инкубации в течение 1 мес.

лей аммония и лантана не приводило к увеличению количества этих нитрификаторов. Бактерии второй фазы нитрификации представлены только представителями рода *Nitrospira* (рис. 5b), относительная представленность которых снижалась при внесении солей, как лантана, так и аммония.

Таким образом, соли лантана стимулируют процесс нитрификации, но снижают содержание автотрофных нитрификаторов. Вероятно, это связано с активизацией гетеротрофных нитрификаторов. Одним из возможных участников могут быть бактерии рода *Sphingomonas*, которые обладают нитрифицирующей способностью [10], и представленность которых значительно возрастает при внесении солей лантана и аммония.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных экспериментов установлено, что сульфат аммония и хлорид лантана, которые могут поступать в почву с азотными (минеральными и органическими), фосфор-

ными (фосфориты) и лантансодержащими удобрениями, оказывают значительное влияние на почвенное микробное сообщество.

В инкубационных модельных экспериментах показано, что аммоний ингибирует метанотрофную активность на первых этапах инкубации дерново-подзолистой почвы, а положительное влияние лантана прослеживается на протяжении 20 сут. Соли лантана стимулируют процесс потенциальной нитрифицирующей активности, однако в почвах с низкой буферной емкостью возможно уменьшение активности за счет увеличения кислотности. Внесение сульфата аммония в почву в количестве, соответствующем применяемой в сельском хозяйстве дозе (300 кг N–NO₄⁺/га), ведет к увеличению доли протеобактерий в бактериальном сообществе.

В условиях высокого содержания метана происходит значительное (на несколько порядков) увеличение содержания метанотрофов I типа (Gammaproteobacteria), что можно объяснить их высокой адаптивностью и способностью быстро реагировать на доступность субстратов. Одновременно наблюдается увеличение количества лантанозависимых облигатных метилотрофов рода *Methylotenera*. Можно предположить, образование ассоциаций метано- и метилотрофных лантанозависимых бактерий, что приводит к изменениям в активности метанового фильтра почвы. Количество внесенного лантана 5 мкг/г многократно превышает содержание доступного лантана в почве, что создает преимущества для бактерий, обладающих лантансодержащей метанолдегидрогеназой.

Полученные результаты требуют дальнейших исследований возможных механизмов влияния лантана на процессы окисления метана и аммония в почве; определение факторов, влияющих на доминирование в естественных условиях тех или иных микроорганизмов в сообществе; исследование зависимости численности бактерий в экосистемах от выполняемой ими функции. Результаты работы могут способствовать разработке современных подходов регуляции активности почвенного метанового фильтра и сопутствующей микробиоты, что позволит уменьшить негативное влияние глобального потепления климата и стабилизировать запасы почвенного углерода. Данные будут полезны при уточнении безопасных доз аммонийных удобрений и лантансодержащих микродобрений при ведении сельского хозяйства в средней полосе России.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные данные получены при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-24-00418.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ананьева Н.Д., Сусьян Е.А., Гавриленко Е.Г.* Особенности определения углерода микробной биомассы почвы методом субстрат-индуцированного дыхания // Почвоведение. 2011. № 11. С. 1327–1333.
2. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
3. *Котельникова А.Д., Рогова О.Б., Столбова В.В.* Лантаноиды в почве: поступление, содержание, влияние на растения, генотоксичность (обзор) // Почвоведение. 2021. № 1. С. 100–119. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21010056>
4. *Кравченко И.К., Семенов В.М., Кузнецова Т.В., Быкова С.А., Дулов Л.Е., Пардини Д., Гисперт М., Бокс П., Ван Клинтут О., Гальченко В.Ф.* Физико-химические и биологические факторы, контролирующие окисление атмосферного метана в серых лесных почвах // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 255–260.
5. *Кравченко И.К., Сизов Л.Р., Тихонова Е.Н., Лысак Л.В.* Влияние лантана на состав метанотрофного сообщества дерново-подзолистой почвы // Микробиология. 2022. Т. 91. № 5. С. 638–643. <https://doi.org/10.31857/S0026365622100238>
6. *Мэгарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с.
7. *Фастовец И.А., Котельникова А.Д., Рогова О.Б., Сушков Н.И., Волков Д.С., Проскурнин М.А., Пашкевич Е.Б.* Влияние внесенного в почву лантана на химический состав растений ячменя в условиях вегетационного опыта // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2017. № 88. С. 27–46. <https://doi.org/10.19047/0136-1694-2017-88-27-46>
8. *Чимитдоржиева И.Б., Абашеева Н.Е.* Влияние лантана на микробиологическую активность и динамику азотного фонда почв. Улан-Удэ: Изд-во БГСХА им. В.Р. Филиппова, 2014. 98 с.
9. *Abdel-Haleem A.S., Sroor A., El-Bahi S.M., Zohny E.* Heavy metals and rare earth elements in phosphate fertilizer components using instrumental neutron activation analysis // Appl. Radiat. Isot. 2001. V. 55(4). P. 569–573. [https://doi.org/10.1016/s0969-8043\(01\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s0969-8043(01)00098-7)
10. *Asaf S., Numan M., Khan A.L., Al-Harrasi A.* *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth // Crit. Rev. Biotechnol. 2019. V. 40(2). P. 138–152. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709793>
11. *Bodelier P.L.E., Laanbroek H.J.* Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments // FEMS Microbiol. Ecol. V. 47(3). P. 265–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00304-0)
12. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N. et al.* QIIME al-

- lows analysis of high throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010. V. 7(5). P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
13. Chan A.S.K., Parkin T.B. Methane oxidation and production activity in soils from natural and agricultural ecosystems // *J. Environ. Qual.* 2001. V. 30. P. 1896–1903. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.1896>
 14. Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1(5). P. 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x>
 15. Cowan N., Maire J., Krol D., Cloy J.M., Hargreaves P., Murphy R., Carswell A. et al. Agricultural soils: A sink or source of methane across the British Isles? // *Eur. J Soil Sci.* 2020. V. 72(4). P. 1842–1862. <https://doi.org/10.1111/ejss.13075>
 16. Daims H., Lebedeva E.V., Pjevac P., Han P., Herbold C., Albertsen M., Jehmlich N. et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria // *Nature*. 2015. V. 528(7583). P. 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
 17. Dunfield P.F., Belova S.E., Vorob'ev A.V., Cornish S.L., Dedysh S.N. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2659–2664. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020149-0>
 18. Dutaur L., Verchot L.V. A global inventory of the soil CH₄ sink // *Global Biogeochem. Cycles*. 2007. V. 21. P. GB4013. <https://doi.org/10.1029/2006GB002734>
 19. Griffiths B.S., Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37(2). P. 112–129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>
 20. Forster P., Ramaswamy V., Artaxo P., Bernsten T., Betts R., Fahey D.W., Haywood J. et al. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing // Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change in Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. P. 131–217.
 21. Hu Y., Shu X., He Jia Deng, Ou-Ping Xiao, Hai-Hua Pu, Qin. Influence of lanthanum on microbial biomass C, P and C and P-cycling enzyme activities in tea garden soil // *Arch. Agron. Soil Sc.* 2016. V. 63. P. 700–709. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1235266>
 22. IUSS Working Group WRB. 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome. 192 p.
 23. Kim D.-G., Kirschbaum M.U.F. The effect of land-use change on the net exchange rates of greenhouse gases: a meta-analytical approach // *Biogeosci. Discuss.* 2014. V. 11. P. 1053–1095. <https://doi.org/10.5194/bgd-11-1053-2014>
 24. Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 1346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>
 25. Kravchenko I. Microbial oxidation of the atmospheric methane in natural and agricultural upland soils // *Agro-Environmental Sustainability*. V. 2. Managing Environmental Pollution. Springer, 2017. P. 183–213. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49727-3_10
 26. Le Mer J., Roger P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review // *Eur. J. Soil Biol.* 2001. V. 37. P. 25–50. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01067-6](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01067-6)
 27. Levine U.T., Teal T.K., Robertson G.P., Schmidt T.M. Agriculture's impact on microbial diversity and associated fluxes of carbon dioxide and methane // *The ISME J.* 2011. V. 5. P. 1683–1691. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.40>
 28. Mohanty S.R., Bodelier P.L., Floris V., Conrad R. Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 1346–1354. <https://doi.org/10.1128/aem.72.2>
 29. Powlson D.S., Goulding K.W.T., Willison T.W., Webster C.P., Hütsch B.W. The effect of agriculture on methane oxidation in soil // *Nutr. Cycling Agroecosyst.* 1997. V. 49. P. 59–70. <https://doi.org/10.1023/A:1009704226554>
 30. Saunio M., Bousquet P., Poulter B., Pregon A., Ciais P., Canadell J.G., Dlugokencky E.J. et al. The global methane budget 2000–2012 // *Earth Syst. Sci. Data*. 2016. V. 8. P. 697–751. <https://doi.org/10.5194/essd-8-697-2016>
 31. Smith P., House J.I., Bustamante M., Sobocká J., Harper R., Pan G., West P.C. et al. Global change pressures on soils from land use and management // *Glob. Change Biol.* 2016. V. 22(3). P. 1008–1028. <https://doi.org/10.1111/gcb.13068>
 32. Skovran E., Raghuraman C., Martinez-Gomez N.C. Lanthanides in methylotrophy // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2019. V. 33. P. 101–115. <https://doi.org/10.21775/cimb.033.101>
 33. Stoecker K., Bendinger B., Schöning B., Nielsen P.H., Nielsen J.L., Baranyi C., Toenshoff E.R. et al. Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 2363–2367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506361103>
 34. Vigliotta G., Nutricati E., Carata E., Tredici S.M., De Stefano M., Pontieri P., Massardo D.R. et al. *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic gamma-proteobacterium // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73(11). P. 3556–3565. <https://doi.org/10.1128/AEM.02678-06>
 35. Vorobev A.V., Baani M., Doronina N.V., Brady A.L., Liesack W., Dunfield P.F., Dedysh S.N. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61(10). P. 2456–2463. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028118-0>

Laboratory Study of the Effect of Ammonium and Lanthanum Salts on Methane Oxidation and the Composition of Microbial Communities in Sod-Podzolic Soil

I. K. Kravchenko^{1, *}, L. R. Sizov¹, and L. V. Lysak³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia

²Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry RAS, Chernogolovka, 142432 Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: irinakravchenko@inbox.ru

One of the promising approaches to solving the issues of ecosystem resilience to stress is to assess the response of microbial communities of soils performing important ecological and biospheric functions to natural or anthropogenic impacts. In a model experiment with sod-podzolic soil (Eutric Albic Retisols (Abruptic, Loamic), the inhibitory effect of ammonium and the stimulating effect of lanthanum on the oxidation of methane by soil microorganisms were established. The addition of ammonium and lanthanum reduced the taxonomic diversity of the bacterial community of the soil and changed its structure: the relative content of Gram-positive bacteria of the phylum Actinobacteriota and Bacillota decreased, while the proportion of gram-negative bacteria of the phylum Pseudomonadota increased. The introduction of lanthanum significantly, by several orders of magnitude, increases the relative content in the community of methanotrophs of the genus *Methylobacter* and obligate methylotrophs of the genus *Methylothera*. The results of the work can be used to develop approaches for regulating the activity of the soil “methane filter” and the accompanying microbiota.

Keywords: soil microbial communities, methane cycle, metabolic activity, methanotrophs

ЭКОЛОГИЯ
ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 631.416.5+631.461.4

**ВЛИЯНИЕ ВНЕСЕНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА И ГЛЮКОЗЫ
НА ТЕМПЕРАТУРНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ (Q_{10}) МИНЕРАЛИЗАЦИИ
ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧВ**

© 2023 г. А. И. Матвиенко^а, *, М. С. Громова^а, О. В. Меняйло^б^аИнститут леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Академгородок, Красноярск, 660036 Россия^бJoint FAO/IAEA Centre of Nuclear Techniques in Food and Agriculture,
Soil and Water Management and Crop Nutrition Laboratory, Seibersdorf, 2444 Austria

*e-mail: matvienko.ai@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 14.10.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Изучена температурная чувствительность (Q_{10}) минерализации С в почвах двух типов: серая лесная (Phaeozems, экосистема лесная поляна) и дерново-подзолистая (Retisols, экосистема сосняк мертвопокровный). Показано, что температурная чувствительность больше на лесной поляне, чем в сосняке, и возрастает вниз по почвенному профилю. Глубина почв оказалась самым сильным фактором, определяющим вариацию Q_{10} . Внесение азота (NH_4NO_3) увеличило Q_{10} в верхних горизонтах почв, а внесение глюкозы, наоборот уменьшило Q_{10} в обеих экосистемах. Наиболее сильно эффект внесения глюкозы проявлялся в нижних горизонтах. Совместное внесение глюкозы и азота влияло на Q_{10} также, как внесение только глюкозы, указывая, что доступность легкоразлагаемого субстрата – более сильный фактор, влияющий на температурную чувствительность, чем азот. Полученные данные позволяют прогнозировать изменение вклада гетеротрофной составляющей эмиссии CO_2 из почв при глобальном потеплении, увеличении поступления корневых экссудатов, фитодетрита и экзогенного азота в почву.

Ключевые слова: органический углерод, парниковые газы, цикл углерода, серые лесные (Phaeozems), дерново-подзолистые (Retisols) почвы

DOI: 10.31857/S0032180X22601281, EDN: IEQGJH

ВВЕДЕНИЕ

Почвы – главный источник атмосферного CO_2 . Микробное разложение почвенного органического вещества (гетеротрофное дыхание) – один из основных процессов образования CO_2 в почве, сильно зависимый от температуры [10, 14, 20]. Температурная чувствительность гетеротрофного дыхания определяет будут ли почвы в условиях потепления накапливать–стабилизировать С или терять его в процессе разложения, выделяя CO_2 и дополнительно увеличивая скорость климатических изменений [10]. Температурная чувствительность, показателем которой является коэффициент Q_{10} , может варьировать в зависимости от типа почв, типа экосистемы и глубины почвенного горизонта [2, 3, 6, 15]. Однако факторы, определяющие вариацию Q_{10} , такие как доступный углерод и азот, остаются малоизученными. Это особенно актуально в связи с повышенной экссудацией органического углерода тонкими корнями и микоризой из-за повышенной концентрации CO_2 в ат-

мосфере [24, 26] и эффективностью корневых экссудатов в стабилизации почвенного С [23]. Поступление азота в почвы с удобрениями и азотными депозициями из атмосферы неодинаково влияет на скорость образования CO_2 [4, 8, 12, 25, 27, 28], этот механизм остается недостаточно изученным. Настоящая работа призвана восполнить пробел в знаниях о влиянии минерального азота или легкодоступного органического вещества (глюкозы) на температурную чувствительность Q_{10} разных генетических горизонтов почв, расположенных в двух экосистемах: лесной поляне и сосняка мертвопокровного.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Исследовали образцы разных генетических горизонтов серой лесной почвы (Phaeozems, лесная поляна, профиль АУ–АЕЛ–ВЕЛ–ВТ) и дерново-подзолистой почвы (Retisols, 80-летний сосняк мертвопокровный [7],

Таблица 1. Химические свойства исследуемых почв в двух экосистемах. Приведены средние значения и стандартные ошибки (в скобках) для трех повторностей

Почва	Горизонт	Глубина, см	C, %	N, %	C/N	pH _{H₂O}
Серая лесная (лесная поляна)	AУ	0–10	4.27 (1.02)	0.31 (0.12)	13.83 (0.45)	6.14 (0.22)
	AEL	10–20	2.73 (0.61)	0.18 (0.02)	15.00 (1.43)	5.99 (0.13)
	BEL	20–30	1.63 (0.13)	0.12 (0.01)	13.54 (1.03)	5.83 (0.13)
	BT	30–50	1.9 (0.34)	0.15 (0.01)	12.7 (0.64)	5.79 (0.12)
Дерново- подзолистая (сосновый лес)	AУ	0–10	2.86 (0.02)	0.18 (0.02)	16.34 (0.61)	5.88 (0.02)
	EL	10–15	2.50 (0.13)	0.17 (0.03)	15.07 (0.42)	5.94 (0.03)
	BEL	15–20	2.07 (0.44)	0.15 (0.01)	13.96 (0.44)	5.87 (0.15)
	BT	20–35	1.7 (0.21)	0.13 (0.02)	13.1(0.32)	5.69 (0.14)

профиль АУ–ЕL–BEL–BT), расположенных в районе пос. Памяти 13 борцов, Емельяновский район, Красноярский край [17, 18]. После сбора образцы сразу доставляли в лабораторию для подготовки и измерения потока CO₂. Свежие образцы минеральных горизонтов просеивали через сито диаметром 2 мм для гомогенизации и удаления органических остатков и корней. В почвах определяли содержание C, N, соотношение C/N и pH_{H₂O} (табл. 1).

Измерение скорости образования CO₂, расчет Q₁₀ и варианты обработки. Каждый почвенный образец распределяли по 16 стеклянным сосудам объемом 0.5 л, по 100 г почвы в каждом. Шестнадцать сосудов включали 4 варианта и 4 повторности. Варианты опыта: а) добавление 10 мл воды (контроль), б) внесение 10 мл водного раствора глюкозы (концентрация 2.5 мг С г⁻¹ почвы), в) 10 мл водного раствора нитрата аммония (концентрация 170 мкг N г⁻¹ почвы), г) водного раствора (10 мл) глюкозы и нитрата аммония в вышеуказанных концентрациях.

Схема оборудования для измерения потока CO₂ при разной температуре детально описана ранее [1]. Кратко, сосуды помещали в инкубатор с программируемым температурным режимом. Каждый сосуд соединяли через 16-портовый мультиплексер Li-Cor 8150 с инфракрасным анализатором CO₂ Li-Cor 8100 (Li-Cor Incorporated, США). Пока в одном сосуде происходило измерение, остальные сосуды продували комнатным воздухом для предотвращения накопления CO₂, избыточная концентрация которого лимитирует скорость его образования. Инкубацию почвенных образцов проводили 82 ч при 20°C с регулярным (каждые 8 ч) кратковременным (на 2 ч) понижением температуры на 10°C. Температурный режим во время инкубации соответствовал 10–20°C, влажность 60% полной полевой влагоемкости. Скорость образования CO₂ измеряли каждые 2 ч, получая одно измерение при 10°C на каждые четыре измерения при 20°C.

Для оценки температурной чувствительности минерализации почвенного органического вещества использовали коэффициент Q₁₀. Разница при инкубации в 10°C позволила вычислить коэффициент Q₁₀ как отношение скорости образования CO₂ при большей температуре к скорости при меньшей [11]. Q₁₀ рассчитывали для каждого цикла понижения/повышения температуры по формуле:

$$Q_{10} = (F_1 + F_3)/(2F_2),$$

где F₁ и F₃ – активность выделения CO₂ при 20°C, до и после понижения температуры, F₂ – активность выделения CO₂ при 10°C. Детально схема эксперимента и расчет описаны ранее [1].

По средней скорости выделения CO₂ при 20°C за 82 ч рассчитывали общее количество CO₂, выделившегося за время инкубации. Среднее Q₁₀ рассчитывали как среднее значение из всех Q₁₀, полученных для каждого цикла измерений.

Статистический анализ данных. Скорости образования CO₂ и рассчитанные значения Q₁₀ тестировали на нормальность распределения (тест Колмогорова–Смирнова) и однородность выборки (тест Левина). Затем отдельно для скорости образования CO₂ и для значений Q₁₀ проводили многофакторный дисперсионный анализ вариации с повторяющимися измерениями (40 временных точек для скорости образования CO₂ и 8 точек для Q₁₀). Для потока CO₂ и средних Q₁₀ выполняли многофакторный дисперсионный анализ (табл. 2). Главными факторами были тип экосистемы (2 уровня, соответствующих двум видам экосистемы), глубина почвенного горизонта (4 уровня – 4 горизонта для каждого образца), добавление углерода (2 уровня – контроль, внесение) добавление азота (2 уровня – контроль, внесение). В вариантах, где эффекты главных факторов были значимы, проводили попарное сравнение методом Фишера для определения в каком горизонте или в какой экосистеме эффект был статистически значим. Все эффекты считали достоверными при P < 0.050.

Таблица 2. Результаты многофакторного дисперсионного анализа для общего количества выделившегося CO_2 и средних значений Q_{10} в образцах почв двух экосистем с различными добавками. Жирным шрифтом выделены уровни значимости достоверных эффектов главных факторов и их взаимодействий

Факторы и их взаимодействия	CO_2		Q_{10}	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Экосистема	268	> 0.001	1.6	0.203
Горизонт	2445	> 0.001	343.9	> 0.001
Глюкоза	2859	> 0.001	429.4	> 0.001
Азот	315	> 0.001	33.3	> 0.001
Экосистема × горизонт	98	> 0.001	3.2	> 0.05
Экосистема × глюкоза	72	> 0.001	14	> 0.001
Горизонт × глюкоза	755	> 0.001	69	> 0.001
Экосистема × азот	5	> 0.05	2.5	0.119
Горизонт × азот	74	> 0.001	0.5	0.682
Глюкоза × азот	282	> 0.001	0.6	0.43
Экосистема × горизонт × глюкоза	9	> 0.001	10.9	> 0.001
Экосистема × горизонт × азот	1	0.367	0.4	0.743
Экосистема × глюкоза × азот	3	0.076	5.9	> 0.05
Горизонт × глюкоза × азот	61	> 0.001	2	0.117
Экосистема × горизонт × глюкоза × азот	2	0.159	4.2	> 0.01

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость образования CO_2 . Все образцы почв реагировали на внесение добавок примерно одинаково, поэтому на рис. 1 для примера приведена динамика скорости образования CO_2 за все время инкубации только для одного почвенного образца, отобранного из горизонта АУ дерново-подзолистой почвы соснового леса. Скорость в течение первых 24 ч инкубации снижалась достаточно быстро от 0.19 до 0.10 мкмоль CO_2 кг⁻¹ с⁻¹ в дерново-подзолистой почве сосняка и от 0.15 до 0.07 мкмоль CO_2 кг⁻¹ с⁻¹ в серой лесной почве лесной поляны (данные не приведены), а затем до конца эксперимента намного медленнее. Двукратное уменьшение скорости выделения CO_2 обусловлено быстрым расходом микроорганизмами легкодоступного углерода в почвах, как правило, этот процесс в лабораторных условиях замечен уже в первые сутки [21].

В целом полученные данные по влиянию добавок соответствуют классическим представлениям о действии внесения азота и глюкозы на активность почвенных гетеротрофов. Так, добавление только азота не привело к изменению скоростей образования CO_2 во всех образцах, поскольку влияние азота либо слабое, либо проявляется в более длительных инкубационных экспериментах. Напротив, добавление глюкозы сразу увеличило скорость выделения CO_2 примерно в 3 раза, как в почве сосняка, так и лесной поляны. Однако дальнейшего увеличения скорости выделения CO_2 в течение инкубации не наблюдалось, что

свидетельствует об отсутствии роста микробной биомассы. Как известно, микробное сообщество лимитировано в первую очередь по углероду, его добавление моментально увеличивает скорость минерализации [13]. Совместное добавление глюкозы и азота еще больше увеличило скорость выделения CO_2 из почв. Динамика эмиссии CO_2 в этом варианте за весь период инкубации четко показывает наличие лаг-фазы (0–8 ч), фазы экспоненциального роста (8–22 ч), фазы замедления (22–28 ч), стационарную фазу (28–32 ч) и фазу отмирания (до 82 ч). Наличие этих фаз в динамике выделения CO_2 свидетельствует о росте микробной биомассы за время инкубации, и что в исследуемых почвах для роста микроорганизмов необходима не только глюкоза, но и азот. Таким образом, скорость минерализации С определяется субстратом, а для роста микроорганизмов углеродсодержащего безазотистого субстрата недостаточно, нужен еще азот.

За время эксперимента из почв верхнего горизонта АУ лесной поляны во всех вариантах выделилось большее количество CO_2 , чем из соответствующих вариантов горизонта АУ соснового леса (рис. 2). Это говорит о большей микробиологической активности в почвах поляны. Известно, что влияние типа экосистемы (лес или поляна) на свойства почв наиболее заметно проявляется в подстилках и верхних минеральных горизонтах почв и значительно меньше – в нижних [5].

С глубиной в исследуемых почвах уменьшалось содержание органического углерода, азота, и увеличивалось рН, что привело к сокращению

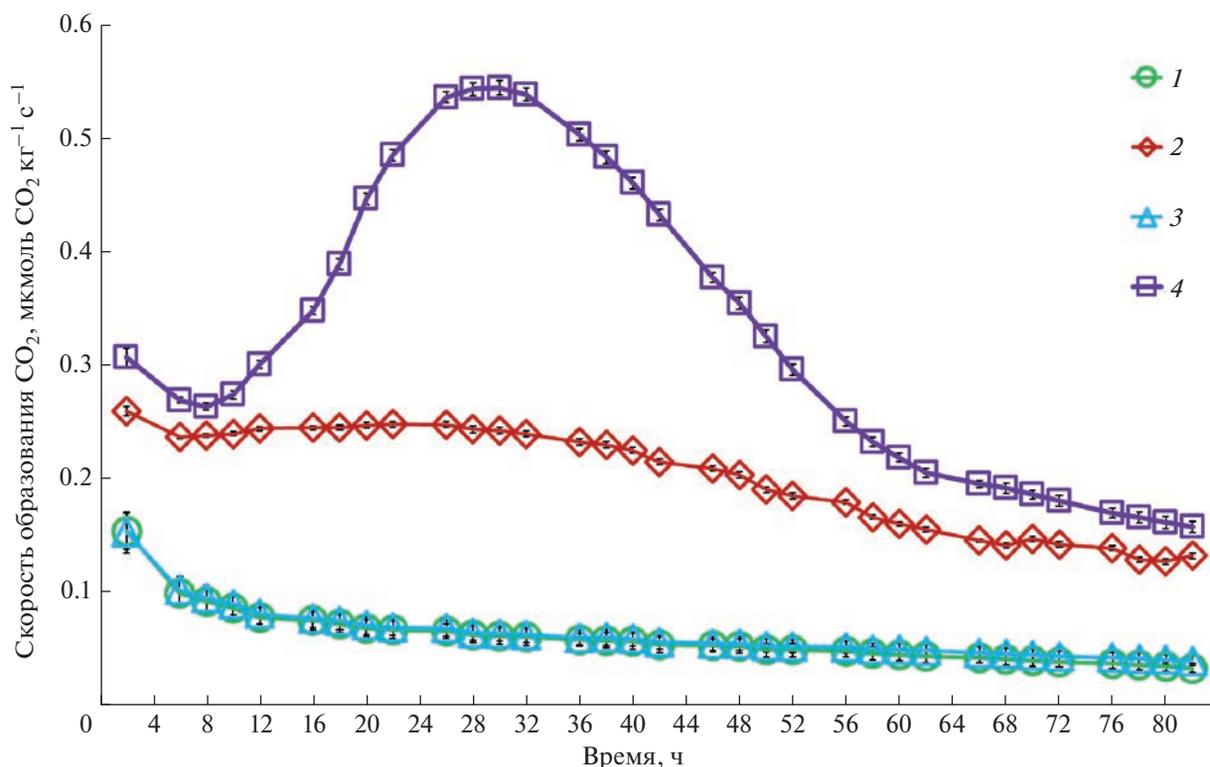


Рис. 1. Динамика скорости образования CO_2 в течение инкубации при 20°C в образцах верхнего горизонта почв из сосняка при внесении различных добавок (1 – контроль, 2 – глюкоза, 3 – азот, 4 – глюкоза и азот).

скорости выделения CO_2 с глубиной в почвах обеих экосистем. Статистически значимой разницы в количестве выделившегося CO_2 между нижними горизонтами не было, как внутри профиля (AEL, BE, BT – в почвах поляны и EL, BEL, BT – в почвах сосняка), так и между типами почв.

Добавление азота увеличило количество выделившегося CO_2 на 5–9% в верхних горизонтах и уменьшило на 1–2% в нижних, но статистической значимости это не имело. Положительный эффект внесения азота становится значимым, только благодаря взаимодействию факторов: горизонт, внесение глюкозы и азота. Причем сильное влияние было в почвах поляны, где совместное внесение глюкозы и азота достоверно увеличило поток CO_2 во всех горизонтах. По сравнению с контролем в зависимости от типа экосистем и глубины горизонта наблюдалось увеличение скорости выделения CO_2 на: 178–533% при добавлении только глюкозы и 304–1176% при добавлении глюкозы и азота совместно.

Температурная чувствительность образования CO_2 .

Несмотря на уменьшение активности выделения CO_2 в течение эксперимента, рассчитанные значения Q_{10} практически не изменялись со временем, что позволило рассчитать средние Q_{10} за весь эксперимент для образцов каждого горизонта двух типов почв с добавками и без (рис. 3).

Значения Q_{10} не отличались между типами почв в верхних горизонтах, но сильно и достоверно увеличивались с глубиной почвенного профиля и варьировали от 1.8 до 3.4 в почвах поляны и от 1.8 до 4.3 в почвах сосняка. Увеличение значений Q_{10} вниз по профилю было ожидаемо, так как подтверждалось ранее [15]. Однако в настоящей работе получены количественные оценки увеличения температурной чувствительности дыхания с глубиной, позволяющие утверждать, что глубина – наиболее сильный фактор из исследованных, определяющих вариацию температурной чувствительности (Q_{10}).

Добавление азота увеличило значения Q_{10} в обеих экосистемах, но влияние азота на разной глубине определялось типом экосистемы. В лесной поляне азот увеличивал значения Q_{10} во всех горизонтах, но статистически незначимо в горизонте BEL. В образцах из соснового леса положительный эффект азота наблюдался только в верхних горизонтах. Особенность лесных почв по сравнению с полянами – более четкая вертикальная стратификация содержания углерода: много в верхних, мало в нижних горизонтах [16]. Напротив, в лесной поляне, как в травянистой экосистеме, корни более глубоко проникают в почвенный профиль, обеспечивая нижние слои свежим углеродом [22]. Возможно, причина наличия эф-

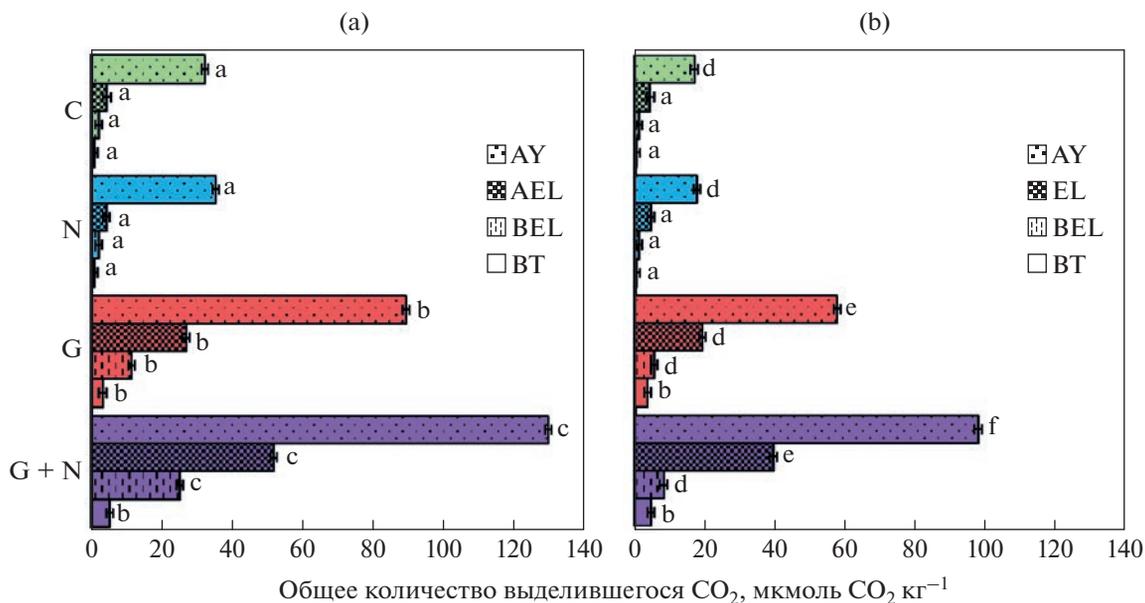


Рис. 2. Вертикальная стратификация общего количества выделившегося CO_2 за 82 ч инкубации по почвенному профилю в почвах лесной поляны (а) и соснового леса (б) с различными добавками (подпись вертикальной оси: С – контроль, N – с азотом, G – с глюкозой, G + N – с глюкозой и азотом). Разные строчные латинские буквы обозначают статистическую значимость различий между выделившимся CO_2 в соответствующих горизонтах почв в разных экосистемах и вариантах опыта.

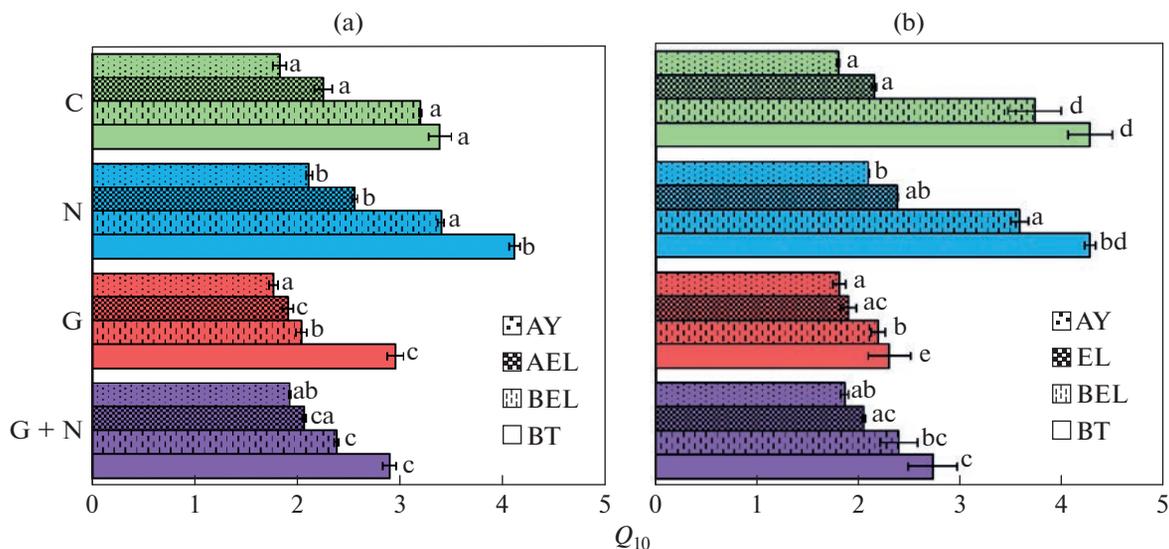


Рис. 3. Распределение по почвенным горизонтам средних значений Q_{10} в почвах двух экосистем – лесной поляны (а) и соснового леса (б) с различными добавками (подпись вертикальной оси: С – контроль, N – с азотом, G – с глюкозой, G + N – с глюкозой и азотом). Разные строчные латинские буквы обозначают статистическую значимость различий между Q_{10} в соответствующих горизонтах почв в разных экосистемах и вариантах опыта.

факта азота на Q_{10} во всех горизонтах поляны объясняется именно этим.

Внесение глюкозы, как показано ранее [1], уменьшало значения Q_{10} в обеих экосистемах, но только в нижних горизонтах, что объясняется низкой доступностью С для микроорганизмов. Внесение глюкозы более резко увеличивает до-

ступность С в нижних горизонтах, что и приводит к уменьшению величины Q_{10} . В верхних горизонтах эффект от внесения глюкозы отсутствовал. Совместное внесение азота и глюкозы имело схожий эффект с вариантом с глюкозой.

В целом обнаружено разнонаправленное действие добавок на Q_{10} . Внесение азота увеличивает

температурную чувствительность в образцах с большим количеством почвенного органического вещества, а внесение глюкозы ее уменьшает в почвах нижних горизонтов, где активность микроорганизмов наиболее лимитирована углеродом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена температурная чувствительность минерализации органического вещества в двух контрастных экосистемах: лесной поляны и сосняка. Несмотря на большие различия в свойствах почв, структуре микробного сообщества, обнаружены общие закономерности: в обеих экосистемах значения Q_{10} резко увеличиваются с глубиной, добавление глюкозы уменьшает Q_{10} в глубоких горизонтах, добавление азота, наоборот, увеличивает Q_{10} в верхних горизонтах, относительно богатых легкодоступным органическим веществом. Сделаны следующие выводы:

1. Глубина почвы определяет температурную чувствительность S минерализации сильнее, чем тип экосистемы, добавление азота или углерода.

2. Внесение азота значимо не влияло на количество выделяющегося углерода, но увеличивало температурную чувствительность минерализации S в почвах обеих экосистем, в горизонтах, богатых доступным органическим веществом.

3. Добавление легкоразлагаемого субстрата (глюкозы) уменьшало температурную чувствительность минерализации S в нижних горизонтах до уровня значений Q_{10} верхних горизонтов, что указывает на обусловленность высоких Q_{10} нижних горизонтов недостатком органического вещества.

4. В почвах Красноярской лесостепи скорость минерализации S определяется наличием легкодоступного субстрата, а для роста микроорганизмов, углеродсодержащего безазотистого субстрата недостаточно, еще необходим азот. При увеличении поступления S в почву из-за повышенного содержания CO_2 в атмосфере рост микробной биомассы будет определяться поступлением азота извне. Экспериментально показано, что внутреннего потенциала почв произвести минеральный азот для поддержки роста биомассы недостаточно.

Из-за контрастных различий изученных экосистем, обнаруженные закономерности, скорее всего, носят общий характер и будут проявляться в других почвах умеренной и бореальной лесной зоны. Лабораторные инкубационные эксперименты не заменяют полевых исследований, но данные, полученные в строго контролируемых условиях, помогают выявить влияние отдельных факторов на температурную чувствительность, что необходимо для моделирования процессов углеродного цикла [19]. Верификация моделей должна осуществляться в полевых опытах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты № 18-54-52005 и 19-29-05122.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова М.С., Матвиенко А.И., Макаров М.И., Ченг Ш.К., Меняйло О.В. Температурная чувствительность (Q_{10}) базального дыхания как функция количества доступного углеродного субстрата, температуры и влажности // Почвоведение. 2020. № 3. С. 366–371.
2. Каганов В.В., Курганова И.Н. Оценка скорости минерализации органического вещества основных типов почв европейской части России при различных температурных режимах // Региональные геосистемы. 2011. Т. 16. № 15. С. 145–153.
3. Ларионова А.А., Квиткина А.К., Евдокимов И.В., Быховец С.С., Стулин А.Ф. Влияние температуры на интенсивность разложения лабильного и устойчивого органического вещества агрочернозема // Почвоведение. 2013. № 7. С. 803.
4. Меняйло О.В., Матвиенко А.И., Макаров М.И., Ченг Ш.К. Роль азота в регуляции цикла углерода в лесных экосистемах // Лесоведение. 2018. № 2. С. 143–159.
5. Солодовников А.Н., Рожков В.А. Исследование влияния древесной породы на почву методом дискриминантного анализа // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2019. № 96. С. 22–46.
6. Тархов М.О., Матышак Г.В., Рыжова И.М., Гончарова О.Ю., Бобрин А.А., Петров Д.Г., Петржик Н.М. Температурная чувствительность дыхания почв бугристых торфяников севера Западной Сибири // Почвоведение. 2019. № 8. С. 946–955.
7. Тонконогов В.Д., Герасимова М.И., Лебедева И.И. Классификация почв России: 1997–2004–2008 // Грунтознание. 2008. № 9. С. 142–146.
8. Chen J., Luo Y., Li J., Zhou X., Cao J., Wang R.W. et al. Costimulation of soil glycosidase activity and soil respiration by nitrogen addition // Global Change Biology. 2017. V. 23. № 3. P. 1328–1337.
9. Craine J.M., Fierer N., McLaughlan K.K. Widespread coupling between the rate and temperature sensitivity of organic matter decay // Nature Geoscience. 2010. V. 3. № 12. P. 854–857.
10. Davidson E.A., Janssens I.A. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change // Nature. 2006. V. 440. P. 166–169.
11. Fang C., Moncrieff J.B. The dependence of soil CO_2 efflux on temperature // Soil Biol. Biochem. 2001. V. 33. № 2. P. 155–165.
12. Janssens I.A., Dieleman W., Luyssaert S., Subke J.A., Reichstein M., Ceulemans R. et al. Reduction of forest soil respiration in response to nitrogen deposition // Nature geoscience. 2010. V. 3. № 5. P. 315–322.
13. Karhu K., Alaei S., Li J., Merilä P., Ostonen I., Bengtson P. Microbial carbon use efficiency and priming of soil organic matter mineralization by glucose additions in bo-

- real forest soils with different C : N ratios // *Soil Biol. Biochem.* 2022. V. 167. P. 108615.
14. *Kuzyakov Y.* Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods // *Soil Biol. Biochem.* 2006. V. 38. № 3. P. 425–448.
 15. *Li J., Pei J., Pendall E., Reich P.B., Noh N.J., Li B. et al.* Rising temperature may trigger deep soil carbon loss across forest ecosystems // *Adv. Sci.* 2020. V. 7. № 19. P. 2001242.
 16. *Menyailo O.V., Huwe B.* Denitrification and C, N mineralization as function of temperature and moisture potential in organic and mineral horizons of an acid spruce forest soil // *J. Plant Nutrition Soil Sci.* 1999. V. 162. № 5. P. 527–531.
 17. *Menyailo O.V., Hungate B.A., Zech W.* The effect of single tree species on soil microbial activities related to C and N cycling in the Siberian artificial afforestation experiment // *Plant and Soil.* 2002. V. 242. № 2. P. 183–196.
 18. *Menyailo O.V., Hungate B.A., Zech W.* Tree species mediated soil chemical changes in a Siberian artificial afforestation experiment // *Plant and Soil.* 2002. V. 242. № 2. P. 171–182.
 19. *Patel K.F., Bond–Lamberty B., Jian J., Morris K.A., McKeever S.A., Norris C.G. et al.* Carbon flux estimates are sensitive to data source: a comparison of field and lab temperature sensitivity data // *Environ. Res. Lett.* 2022. V. 17. № 11. P. 113003.
 20. *Phillips C.L., Nickerson N.* Soil Respiration, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, 2015.
 21. *Schädel C., Beem-Miller J., Aziz Rad M., Crow S.E., Hicks Pries C.E., Ernakovich J. et al.* Decomposability of soil organic matter over time: The Soil Incubation Database (SIDb, version 1.0) and guidance for incubation procedures // *Earth System Science Data.* 2020. V. 12. № 3. P. 1511–1524.
 22. *Shahzad T., Rashid M.I., Maire V., Barot S., Perveen N., Alvarez G. et al.* Root penetration in deep soil layers stimulates mineralization of millennia-old organic carbon // *Soil Biol. Biochem.* 2018. V. 124. P. 150–160.
 23. *Sokol N.W., Kuebbing S.E., Karlsen-Ayala E., Bradford M.A.* Evidence for the primacy of living root inputs, not root or shoot litter, in forming soil organic carbon // *New Phytologist.* 2019. V. 221. № 1. P. 233–246.
 24. *Uselman S.M., Qualls R.G., Thomas R.B.* Effects of increased atmospheric CO₂, temperature, and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (*Robinia pseudoacacia* L) // *Plant and soil.* 2000. V. 222. № 1. P. 191–202.
 25. *Yang Y., Li T., Pokharel P., Liu L., Qiao J., Wan Y. et al.* Global effects on soil respiration and its temperature sensitivity depend on nitrogen addition rate // *Soil Biol. Biochem.* 2022. V. 174. P. 108814.
 26. *Zak D.R., Pregitzer K.S., King J.S., Holmes W.E.* Elevated atmospheric CO₂, fine roots and the response of soil microorganisms: a review and hypothesis // *The New Phytologist.* 2000. V. 147. № 1. P. 201–222.
 27. *Zhao G., Zhang Y., Cong N., Zheng Z., Zhao B., Zhu J. et al.* Climate warming weakens the negative effect of nitrogen addition on the microbial contribution to soil carbon pool in an alpine meadow // *Catena.* 2022. V. 217. P. 106513.
 28. *Zhou L., Zhou X., Zhang B., Lu M., Luo Y., Liu L., Li B.* Different responses of soil respiration and its components to nitrogen addition among biomes: a meta-analysis // *Global change biology.* 2014. V. 20. № 7. P. 2332–2343.

Effect of Mineral Nitrogen and Glucose Application on Temperature Sensitivity (Q_{10}) of Mineralization of Soil Organic Matter

A. I. Matvienko^{1, *}, M. S. Gromova¹, and O. V. Menyailo²

¹*Sukachev Institute of Forest SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

²*Joint FAO/IAEA Centre of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Soil and Water Management and Crop Nutrition Laboratory, Seibersdorf, 2444 Austria*

*e-mail: matvienko.ai@ksc.krasn.ru

The temperature sensitivity of C mineralization in the soils of two ecosystems was studied: a forest glade and a dead cover pine forest. It is shown that the temperature sensitivity is higher in the forest glade than in the pine forest and increases down the soil profile. Soil depth was found to be the strongest determinant of Q_{10} variation. The application of nitrogen (NH₄NO₃) increased Q_{10} in the upper soil horizons, and the application of glucose, on the contrary, decreased Q_{10} in both ecosystems, the effect of glucose was most pronounced in the lower horizons. The co-application of glucose and nitrogen affected Q_{10} as well as the addition of glucose alone, indicating that the availability of a readily degradable substrate is a stronger factor influencing temperature sensitivity than nitrogen. The data obtained make it possible to predict the change in the contribution of the heterotrophic component of CO₂ emission from soils during global warming and an increase in the influx of living root inputs, phytodetritus and exogenous nitrogen into the soil.

Keywords: organic carbon, mineralization, greenhouse gases, carbon cycle, gray forest (Phaeozems), soddy-podzolic (Retisols) soils

ЭКОЛОГИЯ
ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.26

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОГО СОСТАВА БЕНТОНИТОВ
ДВУХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ© 2023 г. Д. Д. Кошелева^{а, *}, В. С. Чепцов^а, А. Л. Степанов^а, И. И. Толпешта^а, В. В. Крупская^{а, б}^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия^бИнститут геологии рудных месторождений, петрографии, минералогии и геохимии РАН,
Старомонетный пер., 35, Москва, 119017 Россия

*e-mail: koshadashcheva@gmail.com

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Бентонитовые глины обладают большой площадью удельной поверхности и большим объемом порового пространства, что определяет их высокую сорбционную способность и позволяет использовать в качестве одного из барьеров при строительстве захоронений радиационно-активных отходов. Ожидается, что глубокие геологические хранилища будут функционировать тысячи лет, поэтому актуальна проблема прогнозирования изменений, которые могут произойти с ними за это время. В процессе функционирования хранилищ бентониты могут изменять свои свойства за счет воздействия на них микроорганизмов. В работе проанализирована структура микробного сообщества бентонитов двух месторождений: 10-й Хутор (Россия) и Таганское (Казахстан) – при различных температурах (25 и 60°C) инкубации. В бентоните месторождения 10-й Хутор при инкубации при 60°C выявлено 10 филумов и 92 рода бактерий, а при 25°C – 12 филумов и 94 рода. В бентоните Таганского месторождения при температуре инкубирования 60°C выявлено 14 филумов и 87 родов, а при 25°C – 15 филумов и 123 рода. В образцах преобладали бактерии типов Proteobacteria и Firmicutes. Сделан вывод, что основным фактором, влияющим на формирование микробного сообщества в исследованных бентонитах, является температура, а не химический и минеральный состав исследованных бентонитов.

Ключевые слова: глинистые минералы, микробные сообщества, хранилища радиоактивных отходов, Proteobacteria, Firmicutes

DOI: 10.31857/S0032180X22601360, EDN: IFLAKM

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент разрабатывается система глубинного геологического захоронения радиоактивных отходов. Для создания подобного захоронения используется система многобарьерной конструкции [1–3]. Бентонитовые глины обладают большой площадью удельной поверхности и большим объемом порового пространства, что определяет их высокую сорбционную способность и позволяет использовать в качестве одного из барьеров при строительстве захоронений радиоактивных отходов [4]. Планируется, что глубокие геологические хранилища будут функционировать тысячи лет, поэтому актуальной является задача прогнозирования изменений, которые могут произойти за это время. Чтобы сделать объективный прогноз, нужно понимать условия, в которых будут существовать барьеры в глубинных геологических захоронениях. Согласно [5], температура поверхности канистры с радиоактивными отхо-

дами составляет примерно 160°C, и со временем температура будет постепенно снижаться. Ориентировочно она снизится до 100°C в течение 200 лет. При этом буферный слой из бентонита будет нагреваться неравномерно, и его температура будет варьировать в пределах 60–95°C в зависимости от расстояния до канистры. Следовательно, важно знать, какие изменения будут происходить с бентонитом в условиях захоронения при разном температурном режиме.

В процессе существования инженерного барьера бентониты могут претерпевать изменения не только из-за физического воздействия повышенных температур, но и из-за воздействия микроорганизмов на них [6]. Микроорганизмы были обнаружены в различных исследуемых месторождениях бентонита [7, 8]. Кроме того, микроорганизмы могут быть занесены во время строительства хранилища радиоактивных отходов [9], а также с потоком грунтовых вод во время эксплуатации [10].

В длительном эксперименте, который проводился акционерным обществом по атомной энергии Канады в лаборатории, расположенной под землей, была проведена сравнительная характеристика биомассы микроорганизмов в бентонитах в 1997 и 2007 гг. Установлено, что в 1997 г. биомасса аэробных гетеротрофов в бентонитах составляла в среднем 3.88 КОЕ/г, а анаэробных гетеротрофов – 1.63 КОЕ/г. Через 10 лет была отмечена общая тенденция изменения численности микроорганизмов – количество гетеротрофных аэробов уменьшилось, а численность анаэробных гетеротрофов осталась примерно на том же уровне [8].

В коммерческом бентоните МХ-80 (Вайоминг, США) численность микроорганизмов составляла 1.64×10^5 КОЕ/г аэробных гетеротрофов и 2.5×10^3 КОЕ/г анаэробных гетеротрофов. Доминирующими филумами выступали Firmicutes (77%), Proteobacteria (22.6%). В доминирующем филуме Firmicutes авторы выделили следующие доминирующие классы – *Bacillales* и *Clostridiales* (8.5 и 64% соответственно) [11].

Бентониты разных месторождений характеризуются разным видовым составом микроорганизмов. В бентоните месторождения Almeria в Испании обнаружены бактерии 14 различных филумов таких, как Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria, Nitrospirae, Verrucomicrobia и неопознанный филум. При этом доминировали представители филумов Proteobacteria и Bacteroidetes [7].

В исследовании [15] изучали разнообразие микроорганизмов в бентоните из Китая (уезд Синхэ автономного района Внутренняя Монголия). Наибольшее количество обнаруженных микроорганизмов принадлежало филумам Thaumarchaeota (50%) и Euryarchaeota (10%). Второй по распространенности филум был Proteobacteria (16%) [12]. При оценке классов были выделены следующие доминанты: β -Proteobacteria, Actinobacteria, Thermoplasmata, Bacilli, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Fusobacteria, and Methanobacteria.

В бентоните National Standard (Вайоминг, США) доминировали бактерии филумов Firmicutes (81%), Proteobacteria (10%), Actinobacteria (8%) и Chloroflexi (1%). В доминирующем филуме Firmicutes, можно выделить следующие доминирующие классы – *Bacillales* и *Clostridiales* (21.9 и 57.8% соответственно). В бентоните Canapryll (Канада) было обнаружено три филума: Firmicutes (37%) и Proteobacteria (39%), Chloroflexi (24%) [11].

Микроорганизмы, обитающие в бентонитах, могут изменять свойства минералов в процессе своей жизнедеятельности [13]. Некоторые группы бактерий могут влиять на функционирование компонентов глубинного хранилища радиоак-

тивных отходов, например, сульфидпродуцирующие бактерии, которые могут способствовать коррозии металлических контейнеров [14, 15], и железоредукторы, которые могут восстанавливать Fe(III), локально изменяя физические и химические свойства бентонитов [16]. Кроме того, в результате функционирования микроорганизмов выделяются различные газы, которые могут быть причиной образования трещин в бентонитовой прослойке и нарушать ее герметичность [17].

Из вышесказанного следует, что микроорганизмы являются одним из факторов, способных повлиять на функционирование хранилища радиоактивных отходов.

Цель работы – оценка состава микробного сообщества глин месторождений 10-й Хутор (Республика Хакасия, Российская Федерация) и Таганское (Республика Казахстан), которые предполагается использовать для конструирования хранилища радиоактивных отходов, при разных температурных условиях инкубации.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были бентониты месторождений 10-й Хутор и Таганское.

Месторождение Таганское расположено в Республике Казахстан, в Тарбагатайском районе Восточно-Казахстанской области, в 445 км к юго-востоку от г. Усть-Каменогорска, в 20 км к юго-востоку от с. Акжар, в 74 км к западу от пристани Тарбагатай на оз. Зайсан [18]. Месторождение 10-й Хутор расположено в Российской Федерации, в 8 км юго-западнее г. Черногорска Усть-Абаканского района [19, 20].

Бентониты отличаются по минеральному и химическому составу (табл. 1, 2) [21, 22]. Оба имеют практически одинаковое содержание монтмориллонита. В месторождении Таганское больше кварца и кальцита по сравнению с месторождением 10-й Хутор. Только в бентоните месторождения Таганское есть пирит и полевые шпаты. В бентоните месторождения 10-й Хутор почти в 4 раза больше содержание иллита, чем в месторождении Таганское. В бентоните месторождения 10-й Хутор присутствуют примеси каолинита, микроклина и альбита (около 4%).

В бентоните месторождения Таганское содержится больше железа, чем в месторождении 10-й Хутор. В бентоните месторождения 10-й Хутор отмечаются оксиды фосфора и титана [21, 22].

Эксперимент по инкубированию бентонитов проводили следующим образом. Навески бентонитов массой 100 г помещали во фторопластовые стаканы, приливали к ним 300 мл раствора минеральных солей с pH 7.3, стаканы плотно закрывали крышками и помещали в термостат на 6 мес., при температурах 25 и 60°C. Раствор солей ими-

Таблица 1. Минеральный состав исследуемых бентонитов, %

Порода	10-й Хутор	Таганское
Монтмориллонит	77.1	73
Микроклин	3.3	–
Иллит	3.7	1
Кварц	13.3	22.5
Плагиоклазы (Альбит)	4.9	–
Кальцит	0.7	2.3
Каолинит	0.7	–
Пирит	–	1.2
Полевые шпаты	–	<0.5
Сумма	100.0	100.0

тировал состав грунтовых вод, планируемого места создания хранилища радиоактивных отходов. Данные о составе используемого раствора опубликованы ранее [23].

После 6 мес. инкубирования образцы высушивали при температуре 60°C. Из высушенных бентонитов экстрагировали ДНК. Для экстракции использовали навеску 250 мг хорошо усредненно-го образца. Экстракцию ДНК проводили при помощи набора для выделения ДНК DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для определения микробного состава бентонитов проводили высокопроизводительное секвенирование генов 16S рРНК бактерий на платформе Illumina. Ампликоны получали с использованием праймеров 515F+Pro-mod-805R (последовательность 5' – GTGBCAGCMGCCGCGG-TAA 3' и 5' – GACTACNVGGGTMTCSTAATCC 3' соответственно) [24, 25]. Были получены парно-концевые прочтения по 250 пн. Секвенирование проводили в компании Knomics-Biota [26]. Данные анализировали с помощью Mothur v.1.44.3 [27] согласно протоколу MiSeq SOP [28] с использованием SILVA SEED v132 для выравнивания и SILVA v138 для таксономической классификации [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество качественных прочтений варьировало в диапазоне от 67899–90001 на образец. Покрываемость для всех образцов была не ниже 96%.

Таблица 2. Химический состав исследуемых бентонитов, %

Месторождение	Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	K ₂ O	CaO	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	P ₂ O ₅	MnO	ППП*
Таганское	1.1	3.75	16.29	61.61	0.22	1.42	6.67	–	–	–	7.97
10-й Хутор	1.04	2.96	18.1	58.87	0.64	1.38	4.17	0.74	0.14	0.09	7.64

* Потери при прокаливании.

В бентоните месторождения 10-й Хутор при инкубации 60°C было идентифицировано 10 филумов и 92 рода бактерий, при инкубации 25°C – 12 филумов и 94 рода. В бентоните месторождения Таганское при инкубации 60°C было идентифицировано 14 филумов и 87 родов, при инкубации 25°C – 15 филумов и 123 рода.

При анализе альфа-разнообразия при помощи индекса Чао наибольшее разнообразие бактерий было выявлено в образце месторождения Таганское, инкубированного при 60°C, а наименьшее – в образце месторождения 10-й Хутор, инкубированного при температуре 60°C. Индекс Шеннона показал аналогичные результаты (табл. 3).

Во всех образцах доминировали бактерии филума Proteobacteria (>55% последовательностей). В образцах, инкубированных при 60°C, доля филума Firmicutes увеличилась на 21.7–22.5%. В образце бентонита Таганского месторождения, инкубированного при температуре 60°C, доля филума Actinobacteriota уменьшилась на 3.9%. Образец из месторождения 10-й Хутор имел высокую долю филума Bacteria_unclassified. В обоих бентонитах доля филума Proteobacteria в образцах, инкубированных при 60°C, была на 25–39% меньше, чем в образцах, инкубированных при 25°C (рис. 1).

Во всех исследуемых образцах при обеих температурах инкубации доминировал класс Gammaproteobacteria. В образцах, инкубированных при 60°C, доля микроорганизмов класса Symbiobacteriia составляла 19 и 4.6% для месторождений 10-й Хутор и Таганское соответственно. При 25°C бактерии класса Symbiobacteriia идентифицированы не были.

При 60°C в бентоните месторождения 10-й Хутор также обнаружены неидентифицированные классы домена Bacteria (Bacteria_unclassified) и филума Firmicutes (Firmicutes_unclassified) (22.7 и 2.8% соответственно), а в бентоните месторождения Таганское, инкубированном при той же температуре (60°C), кроме вышеперечисленных, обнаружены среди доминантов классы Bacilli, Actinobacteria и Firmicutes_unclassified (11.9, 6 и 7.4% соответственно). В бентонитах, инкубированных при 25°C, выявлены бактерии класса Alphaproteobacteria в отличие от образцов, инкубированных при 60°C (рис. 2).

Во всех четырех исследуемых образцах доминировали бактерии семейства Comamonadaceae

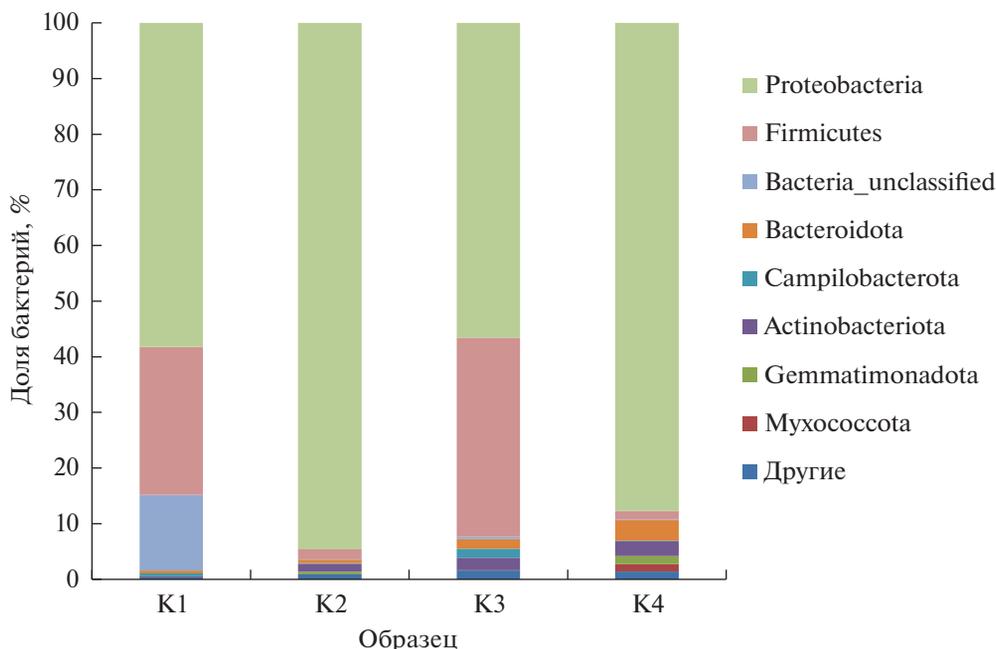


Рис. 1. Структура микробных сообществ исследуемых образцов на уровне филумов: K1 – 10-й Хутор, 60°C; K2 – 10-й Хутор, 25°C; K3 – Таганское, 60°C; K4 – Таганское, 25°C.

(β -Proteobacteria). В обоих образцах бентонитов, инкубированных при 60°C, также доминировали неидентифицированные бактерии (*Bacteria_unclassified*) и представители рода *Caldinitratiruptor* (Firmicutes).

В образцах бентонитов обоих месторождений после инкубирования при 25°C доминировали неидентифицированные бактерии порядка Burkholderiales (β -Proteobacteria), также многочисленными оказались представители семейства Oxalobacteraceae

(β -Proteobacteria) и рода *Cavicella* (γ -Proteobacteria) (рис. 3).

Анализируя структуру бактериальных сообществ на уровне рода можно отметить, что во всех исследуемых образцах доминантным родом являлся неидентифицированный род семейства Comamonadaceae. В образцах, которые были инкубированы при 25°C, доля Burkholderiales_unclassified была больше, чем при 60°C. После инкубирования при 25°C в бентоните Таганского месторож-

Таблица 3. Значения индексов альфа разнообразия: K1 – 10-й Хутор, 60°C, K2 – 10-й Хутор, 25°C, K3 – Таганское, 60°C, K4 – Таганское, 25°C

Образец	Число обнаруженных ОТЕ	Обратный индекс разнообразия Симпсона	Нижняя граница доверительного интервала	Верхняя граница доверительного интервала	Индекс Чао	Нижняя граница доверительного интервала индекса Чао	Верхняя граница доверительного интервала индекса Чао	Индекс Шеннона	Индекс выравненности
K1	2231.9	5.59	5.53	5.66	11 101.6	9658.1	12825.8	2.79	0.34
K2	2708.7	7.24	7.13	7.35	13316.3	11733.08	15177.4	3.40	0.41
K3	2460	15.65	15.45	15.86	13691.5	11860.68	15879.1	3.94	0.49
K4	3199.3	13.19	13.02	13.36	13564.8	12185.13	15156.3	3.88	0.46

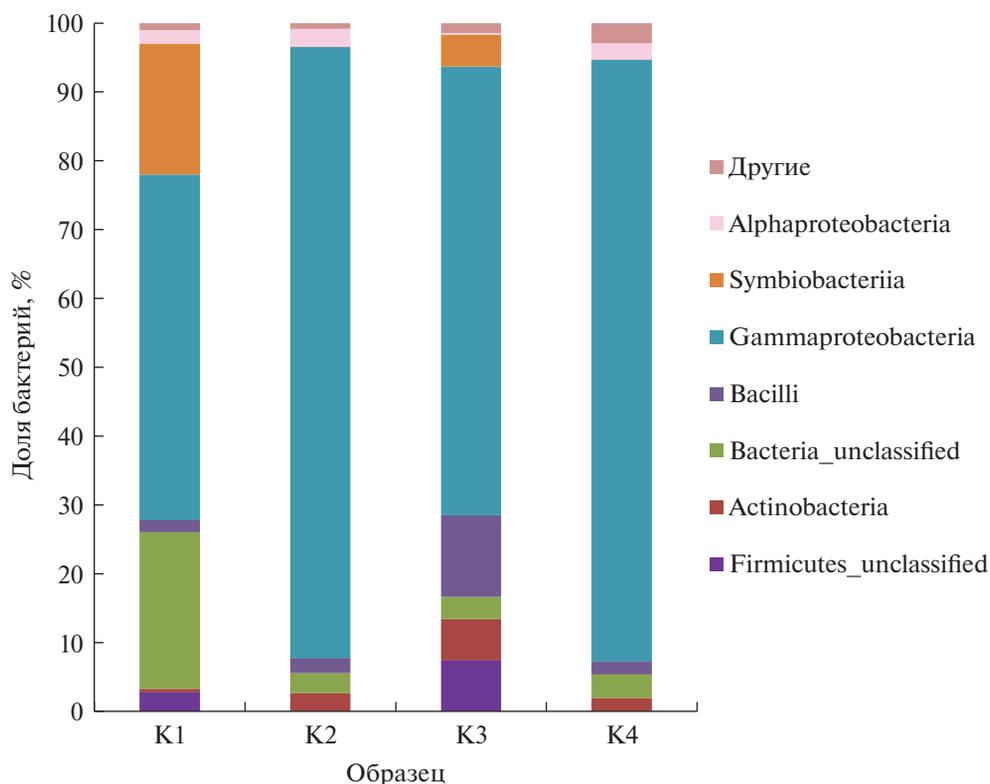


Рис. 2. Структура микробных сообществ исследуемых образцов на уровне классов: K1 – 10-й Хутор, 60°C; K2 – 10-й Хутор, 25°C; K3 – Таганское, 60°C; K4 – Таганское, 25°C.

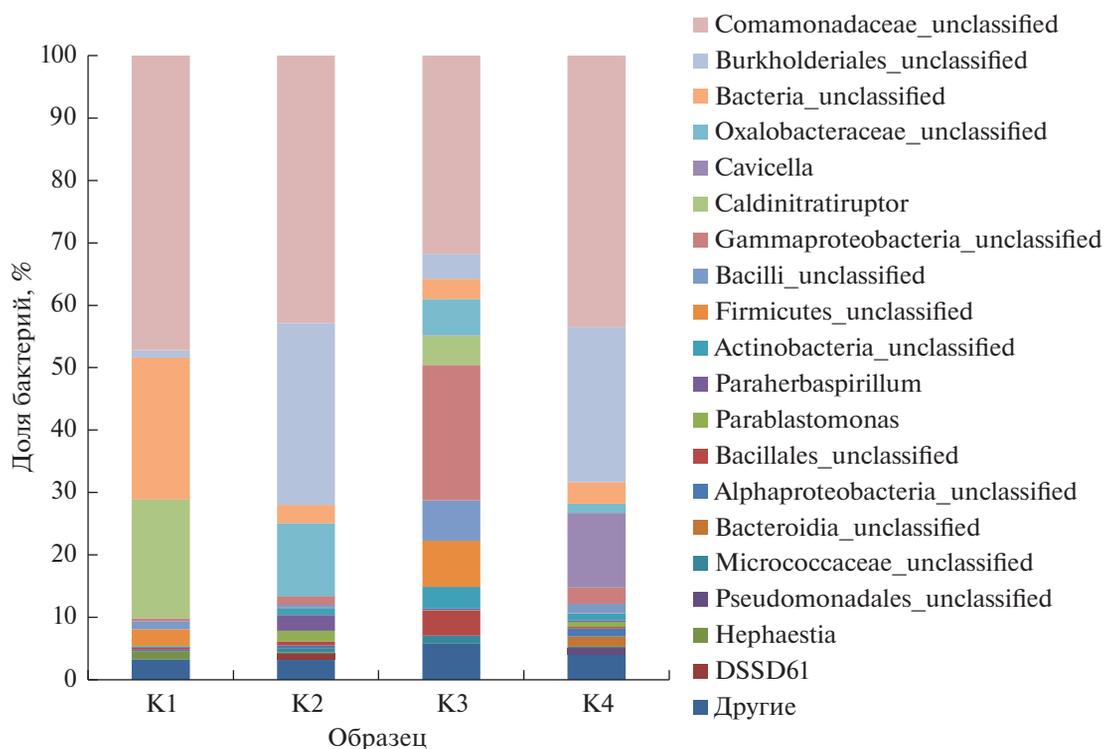


Рис. 3. Структура микробных сообществ исследуемых образцов на уровне рода: K1 – 10-й Хутор, 60°C; K2 – 10-й Хутор, 25°C; K3 – Таганское, 60°C; K4 – Таганское, 25°C.

дения численность неидентифицированного рода *Oxalobacteraceae_unclassified* была больше на 5.9–10.2%, чем в остальных образцах. Род *Caldinitratiruptor* обнаружен в обоих бентонитах, инкубированных при 60°C.

По данным взвешенного UniFrac анализа микробные сообщества образцов K1 (10-й Хутор, 60°C) и K3 (Таганское, 60°C) были наиболее похожи по таксономической структуре и составу. Вторую пару похожих образцов составляли образцы K2 (10-й Хутор, 25°C) и K4 (Таганское, 25°C) (табл. 4).

Во всех четырех образцах доминировали бактерии семейства *Comamonadaceae* (32–47%). Микроорганизмы этого семейства могут влиять на субстраты путем накопления β-гидроксibuтирата, гидролиза ацетамида и восстановление нитрата до нитрита [30], также среди семейства *Comamonadaceae* встречаются анаэробные денитрификаторы и железоредуцирующие бактерии [31]. *Caldinitratiruptor* является факультативной микроаэрофильной нитратредуцирующей бактерией [32]. Данные процессы могут сопровождаться выделением газообразного азота и как следствие способствовать растрескиванию бентонита [23]. Кроме того, все доминирующие группы микроорганизмов являются аэробами и в процессе дыхания выделяют углекислый газ, что также может спровоцировать растрескивание бентонитов. Газогенерация микроорганизмами рассматривается как один из факторов, влияющих на герметичность хранилищ радиоактивных отходов [17].

При сравнении состава микробных сообществ исследуемых бентонитов и других бентонитов можно отметить следующие сходства: во всех бентонитах (MX-80, Almeria, National Standard, бентонит из уезда Синхэ в Китае) большую долю составляют представители филума *Proteobacteria*. В бентонитах месторождений 10-й Хутор и Таганское бактерии филума *Proteobacteria* являются наиболее многочисленными. Также в бентонитах месторождений MX80, National Standard, Canapril и Almeria многочисленными являются представители *Firmicutes*. В бентонитах месторождений 10-й Хутор и Таганское филум *Firmicutes* является одним из доминирующих.

При рассмотрении других таксонов микроорганизмов бентонитов различных месторождений сходства не выявлено, что можно объяснить разным минеральным составом и разными условиями существования микроорганизмов.

Отмеченное увеличение доли представителей филума *Firmicutes* при росте температуры инкубации можно объяснить тем, что представители этого филума способны к образованию спор и обладают высокой устойчивостью к повышенным температурам [33, 34]. Присутствие филума *Actinobacteriota* в образцах, инкубированных при

Таблица 4. Данные анализа UniFrac взвешенный. K1 – 10-й Хутор, 60°C; K2 – 10-й Хутор, 25°C; K3 – Таганское, 60°C; K4 – Таганское, 25°C

Параметр	K1	K2	K3	K4
K1	0	0.642	0.497	0.655
K2	0.642	0	0.626	0.505
K3	0.497	0.626	0	0.554
K4	0.655	0.505	0.554	0

60°C, может быть обусловлено тем, что оптимальные температуры жизнедеятельности многих бактерий этого филума лежат в диапазоне 20–42°C. Это может быть причиной увеличения численности представителей этого филума в образцах, инкубированных при 25°C [35].

Согласно нашим данным, только при 60°C развилась бактерии рода *Caldinitratiruptor*, вероятно, потому что температура инкубации соответствовала оптимальным значениям для жизнедеятельности этого рода – 65°C [32].

Отмеченное выше отсутствие рода *Burkholderiales_unclassified* при 60°C может быть связано с тем, что большинство представителей порядка *Burkholderiales* являются мезофилами с оптимальной температурой роста около 40°C [36].

При анализе филогенетического расстояния между микробными сообществами (UniFrac) сделан вывод, что между собой наиболее похожи бактериальные сообщества образцов месторождений 10-й Хутор (республика Хакасия) и Таганское (Республика Казахстан), инкубированные при 25°C; другую пару похожих образцов составляли бентониты, инкубированные при 60°C. Следовательно, главным фактором, влияющим на формирование микробного сообщества в настоящем исследовании, выступала температура, а не химический и минеральный состав бентонитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено микробное разнообразие двух бентонитов месторождений 10-й Хутор (Хакасия, Россия) и Таганское (Казахстан) при разных температурах инкубации (25 и 60°C). Во всех исследованных образцах доминировали бактерии филума *Proteobacteria*; при 60°C в обоих бентонитах увеличивалась доля бактерий филума *Firmicutes*.

Полученные данные свидетельствуют, что температура инкубации является основным фактором, определяющим таксономический состав и структуру микробных сообществ исследованных бентонитов. Следовательно, в условиях длительной эксплуатации глубинного геологического хранилища состав микробного сообщества может

меняться вместе с изменением температуры внутри хранилища.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания “Микробиомы почв: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, тема 121040800174-6; а также в соответствии с Программой развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”. Исследование минерального и химического состава бентонитов проводили в рамках госбюджетной темы ИГЕМ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belousov P.E., Krupskaya V.V., Zakusin S.V., Zhigarev V.V. bentonite clays from 10th khutor deposit: features of genesis, composition and adsorption properties // RUDN J. Engineering Researches. 2017. V. 18. № 1. P. 135–143. <https://doi.org/10.22363/2312-8143-2017-18-1-135-143>
- Belousov P.E., Krupskaya V.V. Bentonite clays of Russia and neighboring countries // Georesursy. 2019. V. 21. № 3. P. 79–90. <https://doi.org/10.18599/grs.2019.3.79-90>
- Bucher F., Müller–Vonmoos M. Bentonite as a containment barrier for the disposal of highly radioactive wastes // Appl. Clay Sci. 1989. V. 4. № 2. P. 157–177. [https://doi.org/10.1016/0169-1317\(89\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0169-1317(89)90006-9)
- Delage P., Cui Y.J., Tang A.M. Clays in radioactive waste disposal // J. Rock Mechanics Geotechnical Engineer. 2010. V. 2. № 2. P. 111–123. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1235.2010.00111>
- Efimova D., Tyakht A., Popenko A., Vasilyev A., Altukhov I., Dovidchenko N., Odintsova V. et al. Knomics–Biota – a system for exploratory analysis of human gut microbiota data // BioData Min. 2018. V. 11. № 1. P. 25. <https://doi.org/10.1186/s13040-018-0187-3>
- Esnault L., Jullien M., Mustin C., Bildstein O., Libert M. Metallic corrosion processes reactivation sustained by iron-reducing bacteria: Implication on long-term stability of protective layers // Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C. 2011. V. 36. № 17–18. P. 1624–1629. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.10.018>
- Fardeau M.-L., Barsotti V., Cayol J.-L., Guasco S., Michotey V., Joseph M., Bonin P. et al. *Caldinitratiruptor microaerophilus*, gen. nov., sp. nov. isolated from a French hot spring (Chaudes-Aigues, Massif Central): a novel cultivated facultative microaerophilic anaerobic thermophile pertaining to the Symbiobacterium branch within the Firmicutes // Extremophiles. 2010. V. 14. № 3. P. 241–247. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0302-y>
- Grigoryan A.A., Jaliq D.R., Medihala P., Stroes-Gascogne S., Wolfaardt G.M., McKelvie J., Korber D.R. Bacterial diversity and production of sulfide in microcosms containing uncompact bentonites // Heliyon. 2018. V. 4. № 8. P. e00722. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00722>
- Hallbeck L., Pedersen K. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield // Appl. Geochem. 2008. V. 23. № 7. P. 1796–1819. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.02.012>
- Haynes H.M., Pearce C.I., Boothman C., Lloyd J.R. Response of bentonite microbial communities to stresses relevant to geodisposal of radioactive waste // Chem. Geol. 2018. V. 501. P. 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jchemgeo.2018.10.004>
- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L. et al. DegePrime, a Program for Degenerate Primer Design for Broad-Taxonomic-Range PCR in Microbial Ecology Studies // Appl. Environ. Microbiol / Ed. Löffler F.E. 2014. V. 80. № 16. P. 5116–5123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
- Kale R.C., Kapil B., Ravi K. Response of compacted bentonite to hyperalkalinity and thermal history // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. P. 15483. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95023-5>
- Kim J.-S., Kwon S.-K., Sanchez M., Cho G.-C. Geological storage of high-level nuclear waste // KSCE J. Civil Engineering. 2011. V. 15. № 4. P. 721–737. <https://doi.org/10.1007/s12205-011-0012-8>
- Krupskaya V.V., Zakusin S.V., Tyupina E.A., Dorzhieva O.V., Chernov M.S., Bychkova Ya.V. Transformation of the montmorillonite structure and its adsorption properties due to the thermochemical treatment // Geochem. Int. 2019. T. 57. № 3. P. 314–330. <https://doi.org/10.1134/S0016702919030066>
- Liu H., Dang X., Zhang H., Dong J., Zhang Z., Wang C., Zhang R. et al. Microbial diversity in bentonite, a potential buffer material for deep geological disposal of radioactive waste // IOP Conf Ser. Earth Environ. Sci. 2019. V. 227. № 2. P. 022010. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/227/2/022010>
- Lopez–Fernandez M., Cherkouk A., Vilchez–Vargas R., Jauregui R., Pieper D., Boon N., Sanchez–Castro I. et al. Bacterial Diversity in Bentonites, Engineered Barrier for Deep Geological Disposal of Radioactive Wastes // Microbiol. Ecol. 2015. V. 70. № 4. P. 922–935. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0630-7>
- Meleshyn A. Microbial processes relevant for the long-term performance of high-level radioactive waste repositories in clays // Geological Society, London, Special Publications. 2014. V. 400. № 1. P. 179–194. <https://doi.org/10.1144/SP400.6>
- Meleshyn A.Yu., Zakusin S.V., Krupskaya V.V. Swelling Pressure and Permeability of Compacted Bentonite from 10th Khutor Deposit (Russia) // Minerals. 2021. V. 11. № 7. P. 742. <https://doi.org/10.3390/min11070742>
- Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA Primer Systems for Profiling of Thermophilic Microbial Communities // Microbiology (N.Y.). 2019. V. 88. № 6. P. 671–680. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060110>
- Moreno J., López–González J.A., Arcos–Nievas M.A., Suárez–Estrella F., Jurado M.M., Estrella–González M.J., López M.J. Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: A matter of thermo-

- tolerance // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 773. P. 145587. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145587>
21. *Nandakumar R., Shahjahan A.K.M., Yuan X.L., Dickstein E.R., Groth D.E., Clark C.A., Cartwright R.D. et al.* *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States // *Plant Dis.* 2009. V. 93. № 9. P. 896–905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
 22. *Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P.* Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments // *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* 2000. V. 64. № 3. P. 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
 23. *Pannekens M., Kroll L., Müller H., Mbow F.T., Meckenstock R.U.* Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms // *N. Biotechnol.* 2019. V. 49. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.006>
 24. *Pedersen K.* Microbial processes in radioactive waste disposal. 2000. https://www.researchgate.net/publication/264450697_Microbial_Processes_in_Radioactive_Waste_Disposal
 25. *Ranjani A., Dhanasekaran D., Gopinath P.M.* An Introduction to Actinobacteria // *Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications.* InTech, 2016. <https://doi.org/10.5772/62329>
 26. *Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A. et al.* Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. № 23. P. 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
 27. *Smart N.R., Rance A.P., Reddy B., Hallbeck L., Pedersen K., Johansson A.J.* In situ evaluation of model copper-cast iron canisters for spent nuclear fuel: a case of microbiologically influenced corrosion (MIC) // *Corrosion Engineering, Sci. Technol.* 2014. V. 49. № 6. P. 548–553. <https://doi.org/10.1179/1743278214Y.0000000213>
 28. *Steinberg J.P., Burd E.M.* Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli // *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 2014. V. 2. P. 2667–2683. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00238-1>
 29. *Stipanicev M., Turcu F., Esnault L., Schweitzer E.W., Kilian R., Basseguy R.* Corrosion behavior of carbon steel in presence of sulfate-reducing bacteria in seawater environment // *Electrochim. Acta.* 2013. V. 113. P. 390–406. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.09.059>
 30. *Stroes-Gascoyne S., Hamon C.J., Dixon D.A., Martino J.B.* Microbial analysis of samples from the tunnel sealing experiment at AECL's Underground Research Laboratory // *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 2007. V. 32. № 1–7. P. 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2006.01.002>
 31. *Taborowski T. et al.* Bacterial presence and activity in compacted bentonites. Mölnlycke, 2019. <https://igdtp.eu/wp-content/uploads/2019/05/MIND-2019-04-D2.4-BacterialPresenceActivityInCompactedBentonites-v2.pdf>
 32. *Wersin P., Johnson L.H., McKinley I.G.* Performance of the bentonite barrier at temperatures beyond 100°C: A critical review // *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 2007. V. 32. № 8–14. P. 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2006.02.051>
 33. *Willems A.* The family Comamonadaceae // *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria.* 2014. V. 9783642301971. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_238
 34. <http://info.geology.gov.kz/>
 35. https://mothur.org/wiki/miseq_sop
 36. https://mothur.org/wiki/silva_reference_files/

Investigation of the Microbial Communities of Bentonites from Two Different Repositories under Different Temperature of Incubation

D. D. Kosheleva¹*, V. S. Cheptsov¹, A. L. Stepanov¹, I. I. Tolpeshta¹, and V. V. Krupskaya^{1, 2}

¹*Lomonosov Moscow State University, Soil Science Faculty, Moscow, 119991 Russia*

²*Institute of Geology of Ore Deposits, Petrography, Mineralogy and Geochemistry, Russian Academy of Science, Moscow, 119017 Russia*

*e-mail: koshadasheleva@gmail.com

Bentonite clays have a large specific surface area and a large Vume of pore space, which determines their high sorption capacity and allows them to be used as one of the barriers in the construction of deep geological repositories (DGR). It is expected that DGR will function for thousands of years, so the problem of forecasting changes that may occur during this time is relevant. During the functioning of DGR, bentonites can change their properties due to microbiological effects. In this work was analyzed the microbial community structure of two bentonites from 10th Khutor and Taganskoye disposal at different temperatures (25 and 60°C) of incubation. In bentonite from the 10th Khutor deposit, 10 phyla and 92 genera of bacteria were identified during incubation at 60°C, while 12 phyla and 94 genera were identified during incubation at 25°C. In bentonite from the Taganskoye deposit, 14 phyla and 87 genera were identified during incubation at 60°C, and 15 phyla and 123 genera were identified during incubation at 25°C. Samples were dominated with bacteria of Proteobacteria and Firmicutes phyla. It was concluded that is the main factor influencing the formation of the microbial in the studied bentonites community is temperature, and not the chemical and mineral composition of examined bentonites.

Keywords: clay minerals, bentonite, microbial impact

**ЭКОЛОГИЯ
ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

УДК 631.46

**ОЦЕНКА ХИТИНОЛИТИЧЕСКОЙ И АНТИБИОТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ АКТИНОМИЦЕТОВ *STREPTOMYCES AVIDINII* INA 01467
И *MICROMONOSPORA AURANTIACA* INA 01468**

© 2023 г. Г. А. Терегулова^а, О. Н. Синёва^б, Н. Н. Маркелова^б, В. С. Садыкова^б, Г. В. Уваров^а,
М. А. Коваленко^а, Н. А. Манучарова^а *

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^бНаучно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе,
ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1, Москва, 119021 Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2022 г.

После доработки 04.01.2023 г.

Принята к публикации 05.01.2023 г.

Проведена оценка антибиотической и хитинолитической активности у актиномицетов, выделенных из дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol (Loamic)) Московской области (56°07'15" N, 37°30'54" E). На основании культурально-морфологических признаков и анализа гена 16S рРНК выделенные штаммы отнесены к *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468. Оценка антибиотической активности выделенных культур актиномицетов показала, что штаммы проявляют как антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий, так и антифунгальную активность в отношении коллекционных штаммов грибов *Sac. cerevisiae* ИНА 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* ВКПМ F-148. Способность к синтезу противогрибковых соединений увеличивалась при росте на среде с хитином у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, в том числе в отношении фитопатогенного штамма *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148. С помощью метода ПЦР в реальном времени (Real-Time-PCR) было установлено наличие функциональных генов *chitA*, отвечающих за синтез ферментов хитиназ группы А, у исследуемых бактериальных штаммов *Streptomyces* и *Micromonospora*. Наибольшее количество гена обнаружено при росте на хитине у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, оно достигает порядка 15×10^3 копий/мл. Результаты показали наличие у исследуемых штаммов хитиназной и антибиотической активности, в том числе в отношении фитопатогенных грибов, что позволяет использовать их в технологиях защиты растений и биоремедиации почв.

Ключевые слова: полифункциональные актиномицеты, молекулярно-биологические методы, антибиотики, хитинолитики, функциональный ген *chitA*

DOI: 10.31857/S0032180X22601207, **EDN:** IEEWMZ

ВВЕДЕНИЕ

Хитин, являясь структурным полисахаридом членистоногих, кишечнополостных и грибов, широко распространен в наземных и водных экосистемах. По химической структуре хитин – это линейный аминополисахарид, построенный из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-β-D-гликопиранозных звеньев, связанных β-(1-4)-гликозидными связями. Хитин имеет широкий спектр применений в биохимической, пищевой и химической промышленности. Однако вопрос об утилизации отходов промышленной деятельности, связанных с переработкой хитиносодержащих продуктов, по-прежнему актуален. Биоконвертация отходов с помощью микроорганизмов-хитинолитиков является одним из путей решения проблемы со-

хранения баланса экосистем. Деградация хитина возможна с помощью ферментов – хитиназ, продуцентами которых являются бактерии и грибы. Стоит отметить, что производство хитина в морской биосфере составляет миллиарды тонн, но благодаря процессам биоконверсии, которые осуществляют морские хитинолитические бактерии, содержание хитина в морских отложениях низкое [1, 5, 9, 10, 13]. В почвах активно происходит разложение хитина и других труднодоступных полисахаридов микробными сообществами бактерий и грибов, состав которых зависит от климатических зон. Показано, что роль бактерий в разложении хитина больше при высоких температурах, а грибов – при низких. Важную роль в разложении хитина в почвенных экосистемах иг-

рают актинобактерии, у которых обнаружено большое количество генов хитиназы [3, 6, 18].

Почвенные актиномицеты, одновременно со способностью к синтезу антибиотиков, часто содержат гены, кодирующие синтез ферментов, разрушающих труднодоступные соединения, например, азотсодержащий биополимер хитин [6, 18, 17]. Хитиназы обнаружены у актиномицетов родов *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Microbispora*. Разложение актиномицетами природных полимеров, в том числе хитина, связано с функционированием эндо-, экзогидролаз и литических полисахаридных монооксигеназ [1, 6, 17, 19, 20]. Продуценты хитинолитических ферментов часто используются для борьбы с фитопатогенами. В связи с тем, что применение химических фунгицидов наносит серьезный ущерб окружающей среде, биофунгициды рассматриваются как экологически безопасный способ борьбы с фитопатогенами. Кроме того, известно, что хитиназы не только способны к разрушению клеточных стенок фитопатогенных грибов, но и стимулируют рост, развитие растений, повышают их иммунитет [6, 10, 16, 17].

Цель работы – поиск и выделение актиномицетов с полифункциональной активностью (способностью к синтезу антибиотиков и хитинолитических ферментов) из дерново-подзолистой почвы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Образцы дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol (Loamic)) отбирали в Московской области (56°07'15" N, 37°30'54" E). Для выделения актиномицетов почву высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 14 сут, к 0.1 г образца почвы добавляли 9.9 мл стерильной воды, затем суспензию обрабатывали лимонным соком в концентрации 50% от объема суспензии (рН 2) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего суспензию встряхивали на вортексе в течение 5 мин. Аликвоты почвенных суспензий высевали на модифицированную среду Гаузе 2 (триптон – 3.0 г/л, пептон – 5.0 г/л, глюкоза – 10.0 г/л, NaCl – 5.0 г/л, агар – 20.0 г/л) и культивировали в термостате при температуре 28°C в течение 14 сут. Лимонный сок стерилизовали с использованием бактериальных фильтров $d = 0.22$ мкм. Выделенные культуры актиномицетов поддерживали на средах Гаузе 2 и овсяном агаре (овсяная мука – 20.0 г/л, агар – 20.0 г/л).

Антибиотическую активность определяли стандартным методом агаровых лунок при глубинном культивировании актиномицетов на средах Гаузе 1, среде с хитином следующего состава:

1. Среда с хитином, г/л: коллоидный хитин – 4, K_2HPO_4 – 0.3, K_2HPO_4 – 0.7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5,

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0.01.

2. Минеральный агар Гаузе 1, г/л: крахмал растворимый – 20.0, K_2HPO_4 – 0.5, $MgSO_4$ – 0.5, NaCl – 0.5, KNO_3 – 1.0, $FeSO_4$ – 0.01.

В качестве тест-культур использовали следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148. Тест-культуры: *S. aureus* INA 00985, *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 поддерживали на МПА, *E. coli* ATCC 25922 – на LB-агаре, *Sac. cerevisiae* ИНА 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* ВКПМ F-148 – на среде Сабуро.

В качестве параметров, подтверждающих разложение хитина исследуемыми штаммами микроорганизмов, использовали показатели активности дыхания и накопление биомассы исследуемыми культурами микроорганизмов. Опыт проводили следующим образом: чистую культуру микроорганизма помещали в пенициллиновые флаконы (объем инокулята составлял 10% от объема среды) с 5 мл стерильной среды и герметично закрывали стерильными резиновыми пробками. Чистые культуры актиномицетов выращивали в жидкой среде, в которой в качестве единственного источника углерода и азота был хитин. Инкубацию проводили динамически – на качалке (180 об./мин) при температуре 28°C. Контролем во всех экспериментах служили культуры во флаконах с голодной минеральной средой, отличающейся от опытной среды отсутствием хитина. Эксперимент проводили в течение 14 сут.

Эмиссию диоксида углерода культурами актиномицетов определяли на газовом хроматографе с детектором по теплопроводности (модель 3700). Длина колонки 3 м, наполнитель Полисорб-1. Скорость потока газа-носителя (He) 25 мл/мин. Накопление диоксида углерода над образцами оценивали спустя сутки инкубации [4, 10, 15]. Мониторинг интенсивности дыхания проводили в течение 14 сут.

Длину мицелия актиномицетов оценивали с помощью люминесцентно-микроскопического метода. Суспензию обрабатывали на ультразвуковой установке УЗДН-1 (2 мин, сила тока 0.40 А, частота 22 кГц). Суспензию наносили пипеткой на обезжиренное предметное стекло (0.01 мл для определения бактерий) и равномерно распределяли петлей на площади 4 см² (квадрат 2 × 2). Препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре. После фиксации легким нагреванием на пламени газовой горелки препараты

окрашивали водным раствором акридина оранжевого, разведение 1 : 10000; 15 мин. Окрашенные препараты высушивали при комнатной температуре и просматривали на люминесцентном микроскопе Zeiss Mikroskop Axioskop 2 plus (Германия) (светофильтр Filterset 09). Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г почвы, вычисляли по формуле:

$$N = S_1an/vS_2c, \quad (1)$$

где N – число клеток на 1 г почвы; S_1 – площадь препарата, мкм²; a – количество клеток, длина мицелия, мкм в одном поле зрения; n – показатель разведения почвенной суспензии, мл; v – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь полей зрения микроскопа, мкм²; c – навеска почвы, г [1, 17].

Биомассу учитывали расчетным методом. Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см³, а содержание воды в клетках – 80%. Показатель сухой биомассы для 1 м мицелия актиномицетов диаметром 0.5 мкм – 3.9×10^{-8} г [2].

Методы идентификации чистых культур. Культуральные признаки определяли при росте культур на плотных питательных средах Гаузе 1, Гаузе 2, овсяном агаре, используя определитель Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [7].

Морфологию воздушного и субстратного мицелия определяли с использованием микроскопа Olympus BX-41 (Shibuya-ku Tokyo, Япония).

Для изучения геносистематических признаков проводили сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA. Для выделения ДНК актиномицетов использовали набор Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, США), согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили на автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), с набором реагентов фирмы Thermo Fisher Scientific (США) и праймеров: 27F (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') фирмы Синтол (Россия). Секвенирование проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Beverly, MA, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S rRNA выделенных штаммов проводили с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Определение наличия генов *chitA*. Фрагмент бактериального хитиназного гена *chitA* (около 400 п.н.) амплифицировали с помощью “вложенного” ПЦР согласно протоколу [21]: на первом этапе реакции применяли пару CODEНОР-праймеров GA1F-GAIR, на втором этапе – пару консен-

сусных праймеров GASQF-GASQR с GC-клампом на 5'-конце:

GA1F 5' – CGTCGACATCGACTGGGARTD-BCC – 3' GA1R 5' – ACGCCGGTCCAGCCNCKNCCRTA – 3' GASQF 5' – CGTCGACATCGACTGGGA – 3' GASQR 5' – ACGCCGGTCCAGCC – 3' [21].

Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл: 94°C – 5 мин; последующие 35 циклов: 94°C – 1 мин, 57°C – 10 с и 72°C – 1 мин; После окончания последнего цикла смеси дополнительно выдерживали 10 мин при 72°C для достройки незавершенных цепей.

Метод ПЦР в реальном времени применяли для количественного анализа числа копий ДНК представителей бактерий, содержащих функциональные гены *chitA*, кодирующие синтез хитиназ. Измерение проводили на детектирующем амплификаторе DTlite4 ДНК-технология в динамике на определенные сутки роста культур. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программы Real time_PCR. Данный детектирующий амплификатор DTlite4 совмещает в себе функции программируемого термоциклера и оптической системы, позволяющей регистрировать флуоресценцию реакционной смеси в пробирках в ходе полимеразной цепной реакции. Использовали интеркалирующий краситель SYBR® Green и красители, связанные с праймерами (Light cycler – два зонда, связывающие ДНК-мишень на небольшом расстоянии друг от друга). Реакционную смесь готовили из препарата Super Mix Eva Green Biorad (концентрированный буфер с дезоксирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, MgCl₂, красителем EvaGreen и стабилизаторами). Прибор калибровали по зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов. Количество исследуемой ДНК выражали в абсолютных или относительных единицах. Каждое количественное определение матрицы ДНК требует трех стандартов и отрицательного контроля (образца без матрицы ДНК).

В качестве стандарта использовали культуру *Streptomyces violaceus* [sec. Roseus: ser. Roseoviolaceus], способную использовать хитин в качестве единственного источника углерода и азота в среде [21]. Последовательности праймеров, используемых для выявления представителей, обладающих функциональным геном *chitA*, представлены в табл. 1.

Применяли следующий протокол для амплификации: 1 цикл: 94.0°C – 5 мин; 30 циклов: 94.0°C 1 мин; 60°C – 1 мин; 72°C – 1 мин; 1 цикл: 72°C – 3 мин; 1 цикл – 4°C – охлаждение [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Образцы анализировали в 5-кратной повторности.

Таблица 1. Последовательности праймеров для функционального ген *chitA*

Ген	Фермент	Нуклеотидная последовательность праймера (5'-3')	Размер целевого участка (bp)	Ссылка
<i>chitA</i>	Хитиназа семейства 18 гликозил гидролаз	ChiA_F2 (50-CGT GGA CAT CGA CTG GGA RTW YCC-30) 50 end labeled with 50 6-FAM and Reverse primer ChiA_R2 (50-CCC AGG CGC CGT AGA RRT CRT ARS WCA-30)	400	[20]

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение филогенетического положения выделенных штаммов актиномицетов на основании культурально-морфологических признаков и анализа генов 16S рРНК показало, что исследуемые штаммы относятся к *Streptomyces avidinii* (процент совпадения 100%) и *Micromonospora aurantiaca* (доля совпадения 97.99%). Культуры были депонированы в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ “Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе” под следующими номерами: *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468.

Предварительно была проведена оценка способности роста культур актиномицетов на плотных средах с хитином, Гаузе 1 и Гаузе 2 (рис. 1),

которая показала, что штаммы способны к активному росту на данных средах.

В качестве параметров, подтверждающих разложение хитина исследуемыми штаммами микроорганизмов, использовали показатели активности дыхания и накопление биомассы исследуемыми культурами микроорганизмов при их росте на селективной среде, в качестве единственного источника углерода и азота в которой был хитин.

Динамика эмиссии CO₂ штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468, растущими на среде с хитином. При рассмотрении динамики эмиссии CO₂ штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468, растущими на среде с хитином, отмечены следующие особенности. Эмиссия диоксида углерода на среде с хитином была

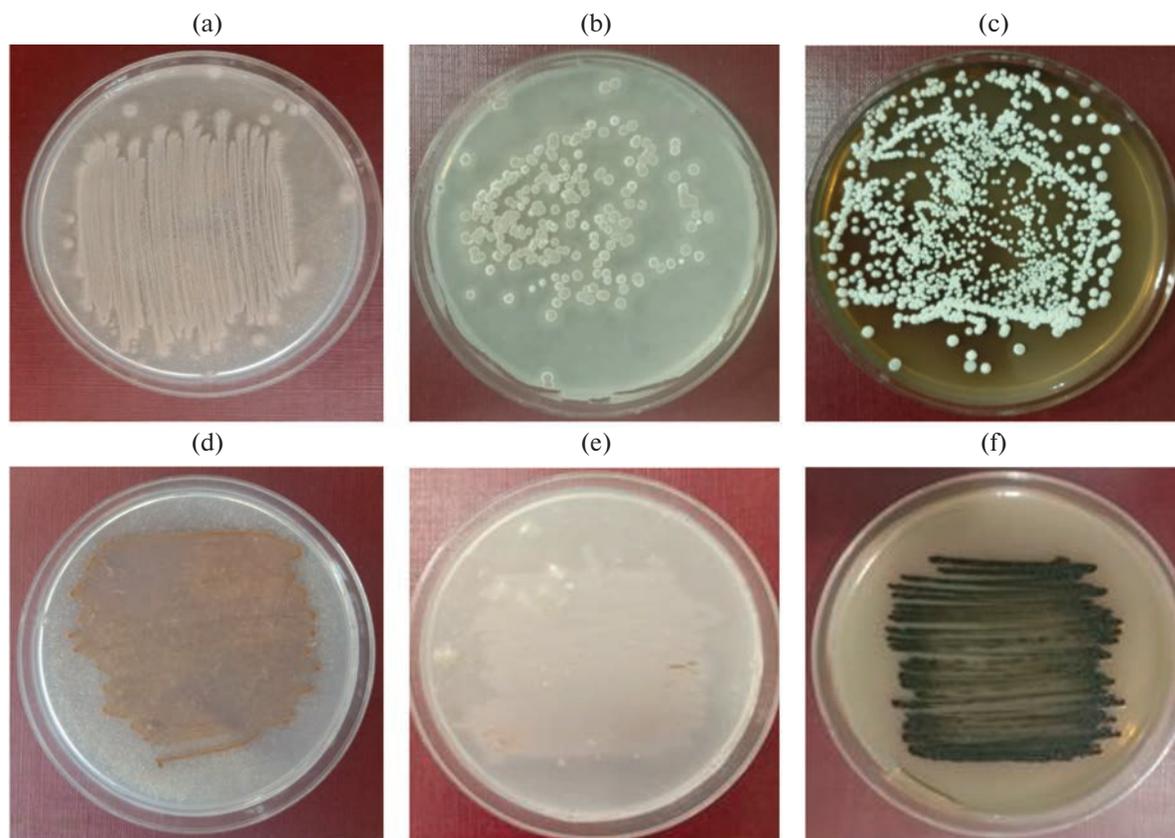


Рис. 1. Рост культур *Streptomyces avidinii* INA 01467 (a, b, c) и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 (d, e, f) на плотных питательных средах: с хитином (a, d) Гаузе 1 (b, e), Гаузе 2 (c, f).

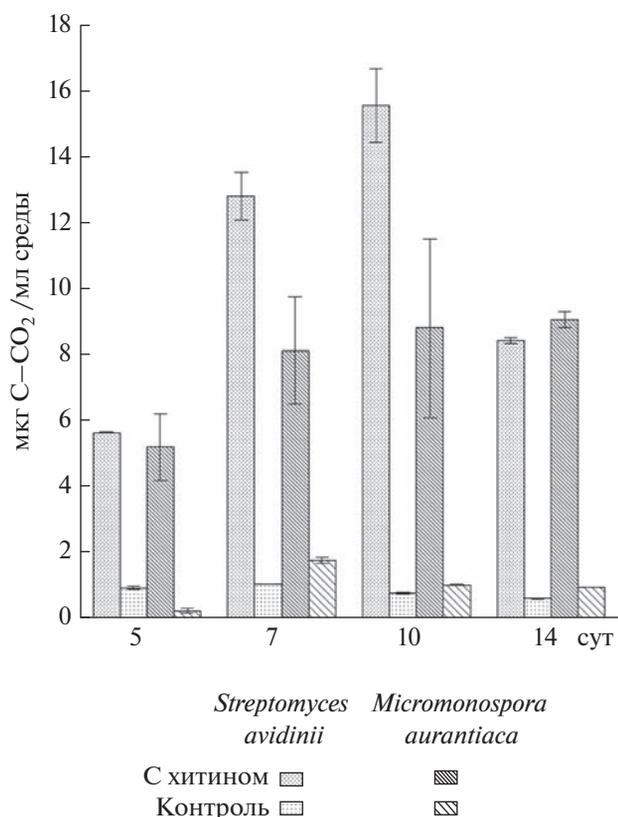


Рис. 2. Динамика эмиссии CO₂ штаммов *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 на среде с хитином и контроль.

больше по сравнению с контролем для обоих штаммов (рис. 2). Для штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467 эмиссия CO₂ на среде с хитином была максимальной на 10 сут эксперимента и достигала 15.57 мкг/мл среды за сутки, что на порядок превышало контрольные варианты. Динамика эмиссии диоксида углерода актиномицетом рода *Micromonospora* имела схожие закономерности, однако максимальные значения эмиссии на среде с хитином были меньше и достигали 8.80 мкг/мл среды за сутки, что в 4–5 раз превышало контрольные варианты (1.77 мкг/мл среды за сутки). Способность микромоноспор к деградации хитина отмечалась и другими авторами [11, 21].

Динамика накопления биомассы штаммами *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 и *Streptomyces avidinii* INA 01467 на среде с хитином. Исследуемые штаммы активно накапливали биомассу при росте на хитине (рис. 3). Максимальные значения для *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 составили 10.9 мкг/мл на 7 сут культивирования, что в 3 раза больше по сравнению с контролем.

Streptomyces avidinii INA 01467 показал максимальную продуктивность на среде с хитином на 14 сут культивирования и по сравнению с ростом на контрольной среде превысил ее значения в 2 раза.

Исследуемые штаммы актиномицетов активно накапливали биомассу на специализирован-

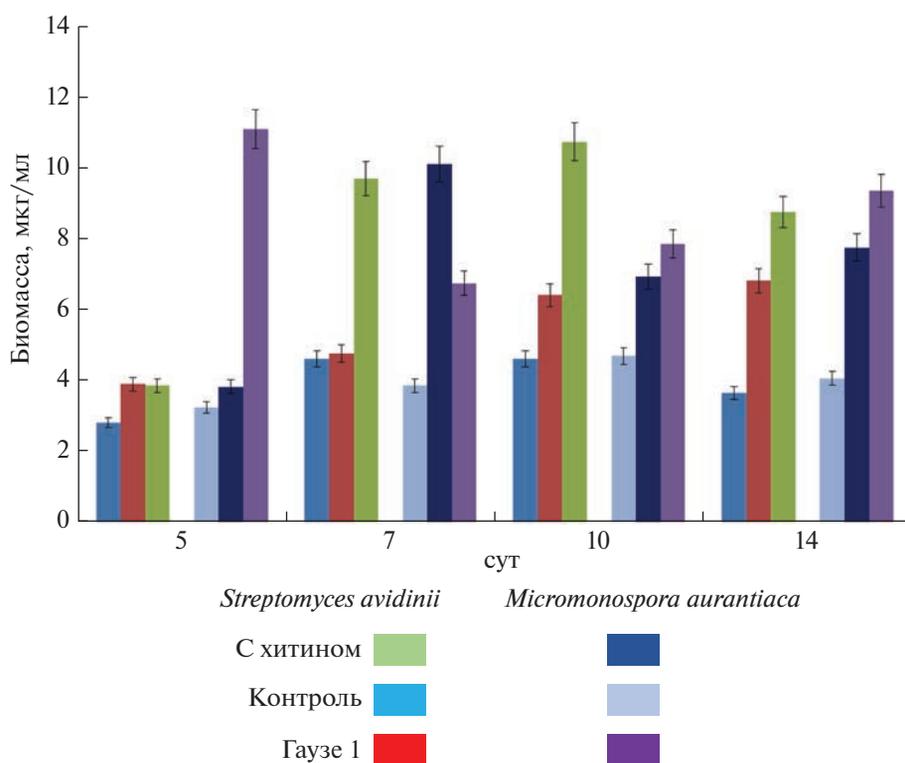


Рис. 3. Динамика накопления биомассы штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 (99 л) и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 (69 л) на разных питательных средах.

Таблица 2. Антибиотическая активность *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 при культивировании на среде с хитином и Гаузе 1 ($n = 5$)

Тест-организм	Зоны подавления роста, мм			
	сутки роста			
	5	7	10	14
Среда с хитином				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	20.4 ± 0.3	15.1 ± 0.4	15.2 ± 0.4	15.2 ± 0.4
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	12 ± 0.4	12.1 ± 0.2	12.1 ± 0.2	12 ± 0.4
Гаузе 1				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	20.3 ± 0.2	15.1 ± 0.4	15.1 ± 0.4	14.9 ± 0.4
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	12 ± 0.4	12 ± 0.4	12.1 ± 0.2	12.1 ± 0.2

Таблица 3. Антибиотическая активность *Streptomyces avidinii* INA 01467 при культивировании на среде с хитином и Гаузе 1 ($n = 5$)

Тест-организм	Зоны подавления роста, мм			
	сутки роста			
	5	7	10	14
Среда с хитином				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	13.25 ± 0.6	15.2 ± 0.4	18.1 ± 0.2	0
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	16.3 ± 0.3	20.4 ± 0.3	18.1 ± 0.2	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	20.3 ± 0.2	20.2 ± 0.3	23.9 ± 0.3	30.1 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	20.4 ± 0.3	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	15.1 ± 0.4	14.5 ± 0.3	12 ± 0.4	12.1 ± 0.2
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	10.3 ± 0.3	10.3 ± 0.3	11.2 ± 0.3	11.1 ± 0.3
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	15.1 ± 0.4	15.1 ± 0.4	13.25 ± 0.6	13.35 ± 0.4
Гаузе 1				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	0	13.1 ± 0.8	13.5 ± 0.6	12.1 ± 0.2
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0	13.5 ± 0.4	13.6 ± 0.6	14.5 ± 0.3
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	10.3 ± 0.3	15.2 ± 0.4	20.4 ± 0.3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	15.1 ± 0.4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	0	15.1 ± 0.4	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	0	10.5 ± 0.3	11.2 ± 0.3	13.3 ± 0.6
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	0	10.5 ± 0.3	12 ± 0.4	15.1 ± 0.4

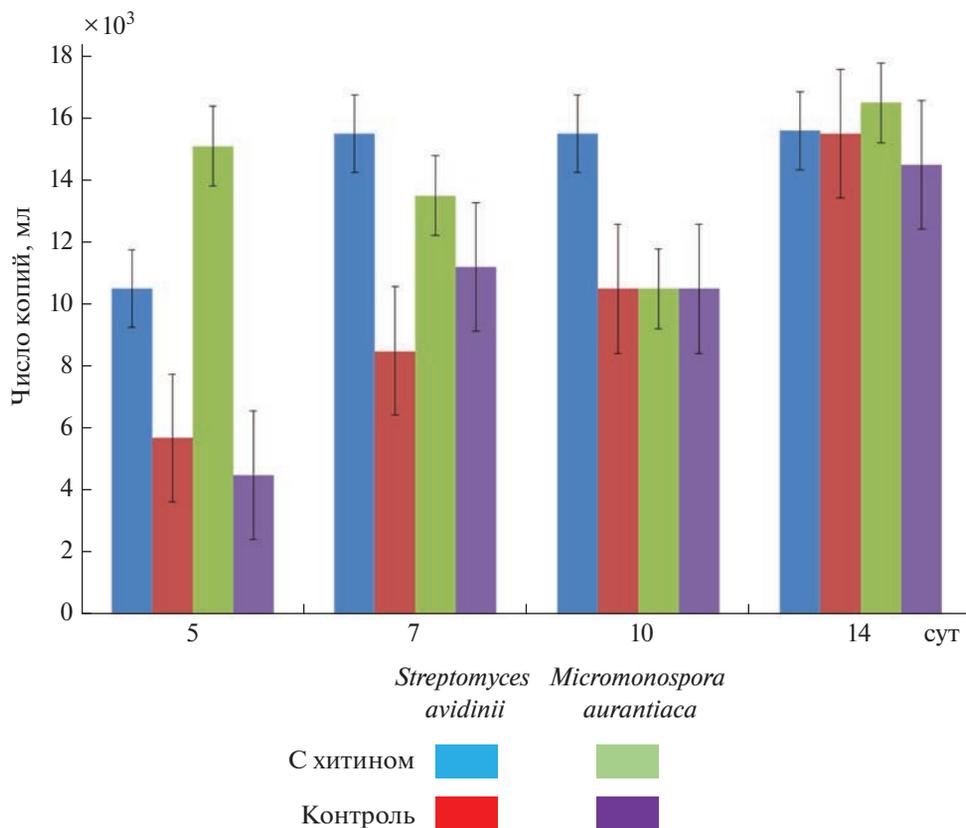


Рис. 4. Динамика численности хитиназных генов (*ChitA*), отвечающих за синтез ферментов хитиназ группы А штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468.

ной для них среде Гаузе 1. При инкубировании на этой среде наблюдали максимальный выход биомассы для обоих штаммов. Таким образом, исследуемые штаммы *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 при росте на среде с хитином активно накапливали биомассу и выделяли CO₂.

Детекция хитиназного гена *chitA*. По результатам определения наличия функциональных генов *chitA*, отвечающих за синтез ферментов хитиназ группы А, у исследуемых бактериальных штаммов *Streptomyces* и *Micromonospora* выявлены следующие закономерности. Наибольшее количество данного гена обнаруживается на 7, 10 и 14 сут при росте на хитине у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, порядка 15×10^3 копий в мл (рис. 4). На среде Гаузе 1 на 5, 7 и 10 сут тем же штаммом образовывалось значительно меньшее количество числа копий гена *chitA*, но к 14 сут число копий возросло и достигло значений, схожих с показателями при росте на хитине.

Количественное определение генов *chitA*, кодирующих хитиназу семейства 18 гликозил гидролаз, в природных экосистемах впервые было определено с применением QС-PCR в озерных осадках о. Ардли (Антарктика) [22], где оно составило от 2.5×10^3 до 4.2×10^7 копий *chitA*/г в зависимости от типа исследуемого образца.

Относительно недавно с помощью ПЦР в реальном времени (Real-Time-PCR) было оценено количество генов *chitA* в ризосфере разных сортов картофеля, выращиваемых в теплице и на поле [12].

Штамм *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 продуцировал наибольшее количество копий *chitA* на 5 и 14 сут. Показатели этого штамма на среде Гаузе 1 были меньше и достигали 14×10^3 копий/мл среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделенные штаммы актиномицетов *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 обладают одновременно хитинолитической и антибиотической активностью. Оценка антибиотической активности выделенных культур актиномицетов показала, что штаммы проявляют антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий, так и антифунгальную активность в отношении коллекционных штаммов грибов *Sac. cerevisiae* ИНА 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* ВКПМ F-148. Способность к синтезу противогрибковых соедине-

ний увеличивалась при росте на среде с хитином у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, в том числе в отношении фитопатогенного штамма *F. oxysporum* ВКПМ F-148. Выделенные штаммы могут быть использованы в технологиях защиты растений и биоремедиации почв. Способность актиномицетов-хитинолитиков к образованию антибиотиков подтверждает экологическую значимость антибиотиков для самих продуцентов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (регистрационный номер 122090800042-2) в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации № 2515-р от 2 сентября 2022 г. в целях реализации важнейшего инновационного проекта государственного значения, направленного на создание единой национальной системы мониторинга климатически активных веществ.

Отбор образцов выполнен в рамках темы государственного задания “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6.

Микробиологические исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00076).

Определение антибиотической активности проводили при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (соглашение № 075-15-2021-1345, уникальный идентификатор проекта RF193021X0012).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта научных интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>
2. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. 175 с.
3. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Менько Е.В., Звягинцев Д.Г. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 219–229.
<https://doi.org/10.1134/S002626171102010X>
4. Поздняков Л.А., Степанов А.Л., Гасанов М.Э., Семенов М.В., Якименко О.С., Суада А.К., Рай А.Н., Щеголькова Н.М. Влияние лигногума на биологическую активность почвы о. Бали, Индонезия // Почвоведение. 2020. № 5. С. 601–609.
<https://doi.org/10.31857/S0032180X20050111>
5. Aly M.M., Sediq A.N., Baghdadi A.M., Amasha R.H. Chitin and chitinases, production, characterization and applications // IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 2019. V. 14. P. 36043.
<https://doi.org/10.9790/3008-1402013643>
6. Bai Y., Eijsink V.G., Kielak A.M., van Veen J.A., de Boer W. Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 38–49.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12545>
7. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology / Eds. J.A. Holt et al. Baltimore etc: Williams and Wilkins, 2012. V. 5. The Actinobacteria.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608>
8. Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K. Bacterial chitinases: properties and potential // Crit. Rev. Biotechnol. 2007. V. 27. P. 21028.
<https://doi.org/10.1080/07388550601168223>
9. Brzezinska M.S., Jankiewicz U., Burkowska A., Walczak M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection // Curr. Microbiol. 2014. V. 68. P. 71–81.
<https://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4>
10. Dahiya N., Tewari R., Hoondal G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. P. 7730782.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>
11. Golovchenko A.V., Gracheva T.A., Lypcan V.A., Dobrovol'skaya T.G., Manucharova N.A. Actinomycete Complexes in Eutrophic Peatlands // Eurasian Soil Science. 2022. T. 55. № 8. P. 1064–1073.
<https://doi.org/10.1134/S1064229322080026>
12. Gschwendmer S., Reichmann M., Müller M., Radl V., Munch J.C., Schloter M. Abundance of bacterial genes encoding for proteases and chitinases in the rhizosphere of three different potato cultivars // Biol. Fertil. Soils. 2010. V. 46. P. 6490652.
<https://doi.org/10.1007/s00374-010-0460-1>
13. Han Y., Yang B., Zhang F., Miao X., Li Z. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China sea sponge *Cranella Australiensis* // Mar. Biotechnol. 2009. V. 11. P. 132–140.
<https://doi.org/10.1007/s10126-008-9126-5>
14. Hobel C.F.V., Hreggvidsson G.O., Marteinsson V.T., Bahrani Mougeot F., Einarsson J.M., Kristjansson J.K. Cloning, expression, and characterization of a highly thermostable family 18 chitinase from *Rhodothermus marinus* // Extremophiles. 2005. V. 9. № 1. P. 53064.
<https://doi.org/10.1007/s00792-004-0422-3>
15. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. Application of pectinases in the commercial sector: a review // Bioresour. Technol. 2001. V. 77. P. 2150237.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
16. Kumar M., Amandeep Brar A., Yadav M., Chawade A., Vivekanand V., Nidhi Pareek N. Chitinases-potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens // Agric. 2018. V. 8. № 88.
<https://doi.org/10.3390/agriculture8070088>

17. Lacombe-Harvey M.E., Brzezinski R., Beaulieu C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 7219–7230.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>
18. Manucharova N.A. The microbial destruction of chitin, pectin, and cellulose in soils // *Eurasian Soil Science.* 2009. V. 42. № 13. P. 1526–1532.
<https://doi.org/10.1134/S1064229309130146>
19. Nawani N.N., Kapadnis B.D., Das A.D., Rao A.S., Mahajan S.K. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2 // *J. Appl. Microbiol.* 2002. V. 93. P. 965–975.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01766.x>
20. Wang Q., Duan B., Yang R., Zhao Y., Zhang L. Screening and identification of chitinolytic actinomycetes and study on the inhibitory activity against Turfgrass Root rot disease fungi // *J. Biosci. Medic.* 2015. V. 3. P. 56065.
<https://doi.org/10.4236/jbm.2015.33009>
21. Williamson N., Brian, P., Wellington E.M. Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinase in the environment // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000. V. 78. P. 315–321.
<https://doi.org/10.1023/A:1010225909148>
22. Xiao X., Yin X., Lin J., Sun L., You Z., Wang P., Wang F. Chitinase Genes in Lake Sediments of Ardley Island, Antarctica // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 790407909.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7904-7909.2005>

Evaluation of the Chitinolytic and Antibiotic Activity of the *Streptomyces avidinii* INA 01467 and *Micromonospora aurantiaca* INA 01468

G. A. Teregulova¹, O. N. Sineva², N. N. Markelova², V. S. Sadikova²,
G. V. Uvarov¹, M. A. Kovalenko¹, and N. A. Manucharova^{1,*}

¹Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

²Research Institute for the Discovery of New Antibiotics named after G.F. Gauze, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: manucharova@mail.ru

The evaluation of antibiotic and chitinolytic activity in actinomycetes isolated from sod-podzolic soil (Albic Retisol (Loamic)) was carried out Moscow region (56°07'15" N, 37°30'54" E). Based on cultural and morphological features and analysis of the 16S rRNA gene, the isolated strains were assigned to *Streptomyces avidinii* INA 01467 and *Micromonospora aurantiaca* INA 01468. Evaluation of the antibiotic activity of isolated actinomycete cultures showed that the strains exhibit both antibacterial activity against gram-positive bacteria and antifungal activity against collection strains of fungi *Sac. cerevisiae* INA 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* VKPM F-148. The ability to synthesize antifungal compounds increased when growing on a medium with chitin in the strain *Streptomyces avidinii* INA 01467, including against the phytopathogenic strain *Fusarium oxysporum* VKPM F-148. Using the Real-Time PCR (Real-Time-PCR) method, the presence of functional genes of *shitA*, responsible for the synthesis of group A chitinase enzymes, was established in the studied bacterial strains of *Streptomyces* and *Micromonospora*. The largest amount of the gene is found when growing on chitin in the strain *Streptomyces avidinii* INA 01467 and reaches about 15×10^3 copies per ml. The results showed the presence of chitinase and antibiotic activity in the studied strains, including against phytopathogenic fungi, which allows them to be used in plant protection technologies and soil bioremediation.

Keywords: multifunctional actinomycetes, molecular biological methods, chitinolytics, functional *chitA* gene

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ БОРРЕЛИДИНА *STREPTOMYCES ROCHEI* 3IZ-6 И ЕГО ПЕРСПЕКТИВЫ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. И. Г. Широких^a, И. А. Остерман^{b, c}, Д. А. Лукьянов^{b, c}, В. И. Марина^{b, c},
М. В. Бирюков^b, О. А. Белозерова^d, Е. Б. Гугля^{d, e}, А. А. Широких^a, Я. И. Назарова^a,
Н. А. Боков^a, Ю. В. Закалюкина^{b, *}

^aФедеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого,
ул. Ленина, 166а, Киров, 610007 Россия

^bМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^cСколковский институт науки и технологий,
Большой бульвар, 30, стр. 1, Москва, 121205 Россия

^dИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия

^eРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

*e-mail: juline@soil.msu.ru

Поступила в редакцию 24.08.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Почвенные актиномицеты выделяли из верхнего горизонта грумусоли (Vertisols) на западном берегу оз. Кинерет в окрестности г. Тверия (Нижняя Галилея, Израиль). Проверка антибиотической активности 26 природных изолятов рода *Streptomyces* с использованием высокопроизводительного скрининга на основе двойной репортерной системы позволила выявить актинобактериальный штамм 3IZ-6, обладающий способностью ингибировать синтез белка. Методами полифазной таксономии штамм 3IZ-6 отнесен к виду *Streptomyces rochei*. Активное вещество *S. rochei* 3IZ-6 выделяли и очищали при помощи гравитационной обращеннофазовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. С помощью toe-print анализа и данных масс-спектрофотометрии продуцируемый антибиотик идентифицировали как боррелидин. При совместном культивировании на твердых средах штамм 3IZ-6 способен подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов: *Fusarium solani*, *F. sambucinum*, *Botrytis cinerea*, а также карантинного объекта *Curtobacterium flaccumfaciens*. Установлено выраженное фитотоксическое действие культуральной жидкости 3IZ-6 на семена пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L). Штамм *Streptomyces rochei* 3IZ-6 может найти применение в биотехнологии как продуцент боррелидина – ценного природного соединения с широким спектром антибиотического действия, в частности, как агент биоконтроля для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенов и сорняков.

Ключевые слова: Vertisols, почвенные стрептомицеты, антибиотический скрининг, антифитопатогенное действие

DOI: 10.31857/S0032180X22601050, **EDN:** IECJXE

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения актиномицетных сообществ в почвах различных биоклиматических зон и географических областей обусловлена в первую очередь широкомасштабным биотехнологическим использованием актиномицетов. С тех пор как З. Ваксман выделил из почвы штамм *Streptomyces griseus* (продуцента первого противотуберкулезного антибиотика стрептомицина), именно почвенные представители филума Actinomycetota стали предметом пристального внимания исследователей. Несмотря на то, что к настоящему вре-

мени выделено и описано около трех тысяч биологически активных молекул, продуцируемых стрептомицетами [25], потребность в обнаружении новых или уточнении природы открытых противомикробных соединений остается актуальной.

Наряду с исключительным среди других прокариот потенциалом антибиотического действия, актиномицеты играют важную роль в биогеохимическом круговороте, в процессах формирования и развития почв. Известно, что абсолютное и относительное обилие актиномицетов увеличи-

ваются при переходе от почв холодного гумидного климата к почвам более южных и засушливых областей [2]. В современной литературе представлена информация об актиномицетных комплексах почв отдельных регионов с различным сочетанием факторов почвообразования, однако сведения об актинобиоте и ее антибиотическом потенциале в почвах, сформированных в условиях средиземноморской влажностной пульсации, недостаточно.

Оз. Кинерет находится на северо-востоке Израиля, в Иорданской рифтовой долине — одном из самых низких на Земле участков суши. Побережье озера расположено ниже уровня моря на 209–215 м [3]. Несмотря на сравнительно высокую минерализацию (содержание хлоридов около 300 мг/л), воды озера пригодны для питья, а само озеро служит крупнейшим резервуаром пресной воды в регионе [4].

Климат побережья оз. Кинерет — субтропический средиземноморский, с продолжительным жарким засушливым летом и прохладной дождливой зимой. Территория относится к средиземноморской флористической области. Естественная растительность состоит из однолетних и многолетних трав (*Oryzopsis* sp., *Avena sterilis*, *Hordeum bulbosum*) и одиноко стоящих деревьев (*Prunus amygdalus*, *Pistacia atlantica*). Расширение сельскохозяйственных угодий и систем орошения вокруг озера привело к почти полному исчезновению естественной растительности [18, 28].

Почвенный покров побережья представлен широким спектром почв, сменяющих друг друга на очень малых расстояниях — в пределах нескольких метров. Почвообразующими породами служат рыхлые коры выветривания базальтов и базальтовых туфов с большим количеством тяжелого по гранулометрическому составу мелкозема [6]. Наиболее характерными для данной территории являются рендзины (Rendzinas), протогрумусоли (Cambisols, Lithosols) и грумусоли (Vertisols) [34]. Последние относятся к наиболее распространенным в этой сложной почвенной мозаике [28].

В настоящей работе представлены результаты исследования состава и антибиотического потенциала актиномицетного комплекса грумусоли и характеристика выделенного из этой почвы нового продуцента ценного антибиотика — боррелидина.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов и выделение актиномицетов. Образцы для исследования отбирали из верхнего слоя (0–10 см) темной слитой трещиноватой глинистой почвы, соответствующей описанию грумусолей [6], согласно мировой коррелятивной базе почвенных ресурсов WRB, Vertisols.

Отбор проводили в феврале 2018 г. под злаковым разнотравьем на окраине г. Тверия, расположенного на западном берегу оз. Кинерет (32°46'43" N, 35°31'36" E) (рис. S1). Анализировали три смешанных образца, каждый из которых составляли объединением пяти индивидуальных проб, отобранных на площади 100 м². Актинобактерии выделяли при поверхностном посеве из разведений почвенных суспензий на казеин-глицериновый агар и среду с пропионатом натрия [9]. В качестве селективного приема почву перед посевом прогревали при 100°C в течение 1 ч. После инкубации (28°C, 21 сут) отбирали выросшие колонии мицелиальных прокариот, объединяя их в отдельные морфотипы, согласно общности культуральных и морфологических признаков. Чистоту выделенных культур определяли общепринятыми методами: микроскопически и высевом на агаризованную минеральную среду Гаузе 1 [1]. Отобранные штаммы поддерживали на скошенном овсяном агаре при +4°C, а при длительном хранении — в виде споровых суспензий в 20% глицероле при –80°C.

Скрининг антибиотической активности. Скрининг выделенных штаммов на антибиотическую активность проводили с использованием репортерной флуоресцентной системы на основе штамма *Escherichia coli* JW5503 ΔtolC с внедренной плазмидой pDualrep2, которая позволяет одновременно с классическим тестом на эффективность ингибирования роста определять механизм действия антибиотика [23]. Выделенные из посева актиномицеты выращивали в течение 10 сут на овсяном агаре, затем из агара с культурами вырезали блоки диаметром 5 мм и помещали их на плотную среду Luria Bennet, предварительно засеянную репортерным штаммом. В присутствии ингибиторов синтеза белка или молекул, нарушающих репликацию ДНК, репортерный штамм после инкубации (37°C, 18 ч) способен вырабатывать флуоресцентные белки RFP и Katushka2S, которые визуализируются в сканере ChemiDoc (Bio-Rad) в каналах Cy-3 и Cy-5 соответственно.

Установление химической природы активного вещества. Экстракция и очистка активного вещества. Штамм 3IZ-6, отобранный при первичном антибиотическом скрининге, выращивали в погруженной культуре (30°C, 10 сут) на шейкере (2000 об./мин) в среде состава (г/л): мальтоза — 10, пептон — 10, гидролизат казеина — 2, дрожжевой экстракт — 2, NaCl — 6. Освобожденную от клеток культуральную жидкость (КЖ) наносили на хроматографическую колонку Poly-Prep Columns (Bio-Rad) с сорбентом LPS-500H (Техносорбент) и затем элюировали в градиенте вода-ацетонитрил (v/v). С помощью скрининга на репортерной системе выявляли активную фракцию. Разделение, очистку и идентификацию целевого вещества осуществляли методами высокоэффектив-

ной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии как описано ранее [30].

Изучение механизма действия активного вещества. Активную фракцию, полученную методом твердофазной экстракции КЖ штамма 31Z-6, концентрировали на вакуумном испарителе (SpeedVac®) и использовали для определения минимальной ингибирующей концентрации в отношении репортерного штамма *E. coli* JW5503 ΔtolC pDualrep2 [26].

Эту фракцию использовали в toe-print анализе [22] и для изучения трансляции *in vitro* [7] с помощью готового набора *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega) согласно инструкции производителя. Трансляцию проводили в течение 30 мин при 37°C, кинетику реакции детектировали на приборе Victor X5 2030 (Perkin Elmer): каждую точку измеряли 30 раз, интервал между раундами измерения составлял 30 с.

Полифазная идентификация штамма-продуцента. **Описание культуральных и морфологических признаков.** Культуральные признаки штамма 31Z-6 учитывали после 21-дневной инкубации при 28°C на мальтозо-дрожжевом (ISP 2), овсяном (ISP 3), крахмало-нитратном (ISP 4), глицерол-аспарагиновом (ISP 5), пептонно-дрожжевом агаре с железом (ISP 6) и тирозинном агаре (ISP 7) [27]. Окраску воздушного и субстратного мицелия оценивали по шкале RAL CLASSIC® и сопоставляли с аналогичными данными, приведенными для близких штаммов в базе BacDive (<https://bacdive.dsmz.de/>).

Форму цепочек и орнаментации поверхности спор изучали с помощью светового (Fisherbrand AX-502, Thermo Fisher Scientific) и сканирующего электронного микроскопа (Camscan-S2).

Определение физиологических особенностей. Рост штамма 31Z-6 при различных температурах (от 4 до 50°C), в диапазоне pH (от 4 до 11 ед.) и при различных концентрациях NaCl (1, 2.5, 5, 6 и 7.5%) оценивали на среде Гаузе 1 после инкубации в течение 8 сут.

Утилизацию природных полимеров, а также способность образовывать кислоту при росте на среде с различными источниками углерода (рис. S2) оценивали как описано ранее [32, 33].

Для оценки чувствительности штамма 31Z-6 к различным антибиотикам использовали диски индикаторные ДИ-ПЛС-50-01 по ТУ 9398-001-39484474-2000 (НИЦФ, Россия).

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рPHK. Амплификацию фрагмента гена 16S рPHK штамма 31Z-6 проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 16SF75 (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-3') и 16SR1100 (5'-TTACTAGCGATTCCGACTTCA-3'). Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) выполняли при следующих условиях: начальная денатура-

ция при 95°C в течение 4 мин, далее 32 цикла (94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с), после чего окончательное удлинение при 68°C в течение 5 мин. Продукты ПЦР секвенировали на анализаторе ДНК ABI3130xl (Thermo Fisher Scientific, USA) в НПК "Синтол" (Россия).

Прямые и обратные прочтения целевого фрагмента редактировали и собирали с помощью программы GeneStudio software Version 2.2.0.0. Итоговую последовательность 16S рPHK депонировали в GenBank (OK412986) (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>) и использовали для сравнительного филогенетического анализа с родственными типовыми штаммами стрептомицетов в программе MEGA software Version X (<https://www.megasoftware.net>). Для построения филограммы применяли методы присоединения соседей (Neighbor Joining, NJ) и максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) для 1000 альтернативных деревьев. Эволюционные дистанции между последовательностями рассчитывали с помощью модели Тамуры-Ней (Tamura-Nei's model).

Анализ ингибиторной активности штамма-продуцента против возбудителей болезней растений. Для оценки способности штамма 31Z-6 угнетать развитие фитопатогенных микроорганизмов использовали штаммы из Всероссийской коллекции микроорганизмов (Пушино) и рабочей коллекции лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФАНЦ Северо-Востока (Киров) (табл. 1). Для роста тест-культур бактерий и оценки методом агаровых блоков антибактериальной активности штамма использовали среду РНМ [10]. Культивирование фитопатогенных грибов и оценку их способности расти в присутствии штамма 31Z-6 проводили на картофельно-декстрозном агаре [8] при 25°C в течение 10–12 сут.

Оценка фитотоксичности штамма 31Z-6. Для оценки возможной фитотоксичности и выделения активного вещества штамма 31Z-6 культивировали как описано выше. Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) замачивали в нативной и разбавленной водой КЖ стрептомицета (1 : 10) на 20 ч и проращивали в рулонной водно-бумажной культуре (20°C, 5 сут), при фотопериоде 16 ч и освещенности 7 кЛк. В контроле семена замачивали в воде. В каждом варианте опыта закладывали в рулоны по 100 семян. Учитывали всхожесть, линейные размеры и воздушно-сухую биомассу проростков. Статистическую обработку данных выполняли стандартными методами с использованием пакета Microsoft Excel 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая численность актиномицетов в образцах исследуемой почвы составила 10^5 – 10^6 колоние-

Таблица 1. Возбудители болезней растений, использованные для оценки антифитопатогенной активности

Микроорганизм	Коллекция, номер штамма	Возбудитель [5]
<i>Fusarium sambucinum</i>	ВКМ F-842	Сухая гниль клубней картофеля
<i>Botrytis cinerea</i>	ВКМ F-4549	Серая гниль томата, перца, кабачка, салата, земляники и др.
<i>Rhizoctonia solani</i>	ВКМ F-2935	Ризоктониоз, стеблевой ожог фасоли
<i>Fusarium oxysporum</i>	ВКМ F-137	Фузариоз фасоли, гороха, фузариозное увядание люпина, фузариозная гниль томата, лука-порея, тыквенных культур
<i>Cercospora carotae</i>	ВКМ F-2164	Церкоспороз моркови
<i>Alternaria solani</i>	ВКМ F-3048	Альтернариозная (бурая) пятнистость томата и баклажана
<i>Fusarium solani</i>	ВКМ F-819	Фузариозная гниль томата и фузариозное увядание тыквенных культур, фузариоз гороха
<i>Oospora pustulans</i> (<i>Polyscytalum pustulans</i>)	ВКМ F-886	Парша бугорчатая, или ооспороз картофеля
<i>Alternaria radicina</i>	ВКМ F-1863	Черная гниль сельдерейных (зонтичных) культур
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ФАНЦ- G29г4	Бактериальное увядание зернобобовых культур (фасоль, горох, соя, маш и др.)
<i>Bacillus aryabhatai</i>	ФАНЦ- G11г3	Нет
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	ФАНЦ-ША	Гельминтоспориозная корневая гниль зерновых культур, темно-бурая пятнистость ячменя
<i>Fusarium proliferatum</i>	ФАНЦ-ТЖ	Болезни многих видов растений, преимущественно в теплицах
<i>F. culmorum</i>	ФАНЦ-Т-8	Фузариоз злаков, корневая гниль многих видов растений
<i>F. oxysporum</i>	ФАНЦ-ШТ	Фузариоз фасоли, гороха, фузариозное увядание люпина, корневая гниль многих видов растений
<i>Alternaria alternata</i>	ФАНЦ-ША	Пятнистость томата, оливковая плесень злаков
<i>Trichoderma</i> sp.	ФАНЦ-ВК	Нет

образующих единиц/г, вне зависимости от используемой среды. Актиномицетный комплекс грумусолей включал представителей родов *Streptomyces* и олигоспоровые формы, которые разграничивали на основе характерных морфологических признаков: образование нефрагментирующегося мицелия, наличие спор на воздушном и/или субстратном мицелии, величина и количество спор в цепочках [12].

По частоте встречаемости (84%) и долевого участию (94.6%) в комплексе мицелиальных прокариот доминировали представители рода *Streptomyces*, что согласуется со многими литературными данными [2]. Олигоспоровые формы актиномицетов встречались с гораздо меньшей частотой (33%). Особенностью стрептомицетного комплекса грумусолей явилось доминирование видов, образующих различные пигменты (представителей секций и серий) [1]: *Cinereus Violaceus* (40%), *Helvolum Flavum Helvolum* (20%) и небольшая доля неокрашенных видов: серии *Cinereus Achromogenes* (11.7%), что очевидно связано с необходимостью защиты клеток стрептомицетов от интенсивной инсоляции.

Для антибиотического скрининга отобрали 26 фенотипически различных стрептомицетов, которые наращивали в погруженных культурах и затем тестировали с помощью двойной репортерной системы. Изолят 3IZ-6 не только ингибировал рост штамма *E. coli* ΔtolC JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, но и инициировал образование им флуоресцентного белка, что свидетельствует о наличии в КЖ штамма 3IZ-6 ингибиторов синтеза белка (рис. S3). Поэтому дальнейшая работа была сфокусирована на изучении данного изолята и синтезируемого им метаболита.

При помощи твердофазной экстракции КЖ штамма 3IZ-6 разделили на отдельные ацетонитриловые фракции. Наибольшей антибиотической активностью в отношении репортерной системы *E. coli* ΔtolC JW5503 pDualrep2 обладала фракция, полученная экстракцией 50%-ным раствором ацетонитрила в воде. Постановка реакции синтеза белка в бесклеточной системе показала, что выделенный образец подавляет синтез белка при содержании ниже минимальной ингибирующей концентрации (рис. S4), что позволяет рассматривать аппарат синтеза белка как его основную ми-

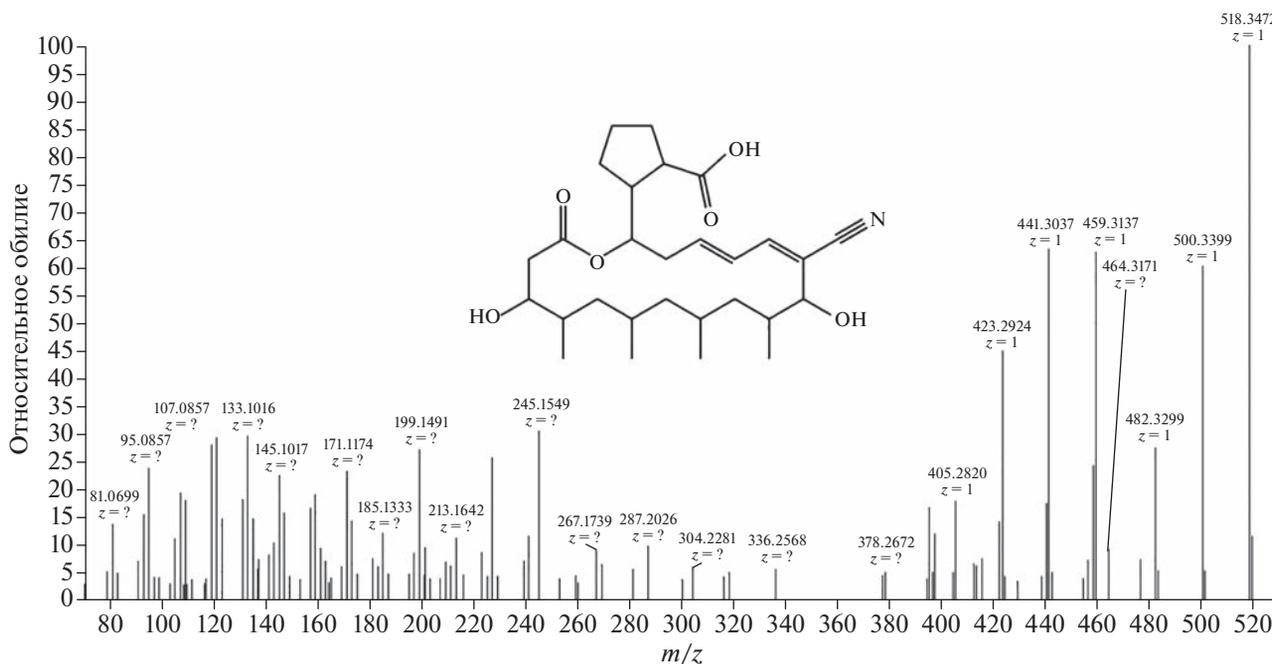


Рис. 1. Структура молекулы боррелидина (C₂₈H₄₃NO₆, молекулярная масса 489.6 г/моль) и спектр MS2.

шень. Разведения 1 : 10 и 1 : 100 активной фракции штамма 31Z-6 полностью подавляют *in vitro* трансляцию, как и положительный контроль – 50 мкг/мл эритромицина.

Поскольку метаболит, образуемый штаммом 31Z-6, оказал однозначное влияние на процесс биосинтеза белка, его было решено протестировать с помощью toe-print анализа для выявления стадии трансляции, на которую он воздействует (рис. S5). Остановка рибосомы произошла на треонинном кодоне в А-сайте рибосомы. Такую активность может демонстрировать известный ингибитор треонил-тРНК-синтетазы – боррелидин [19]. Присутствие боррелидина в образце 31Z-6 подтверждено при помощи масс-спектрометрии (рис. 1).

Боррелидин – уникальный по структуре 18-членный нитрилсодержащий поликетидный макролактон с антибактериальной [11], антимикотической [15], антималярийной [24] и противовирусной активностью [20]. Боррелидин может воздействовать на раковые клетки, благодаря способности подавлять ангиогенез [21], индуцировать апоптоз и ингибировать треонил-тРНК-синтазу [16]. Несмотря на широкий потенциал клинического действия, боррелидин пока не нашел широкого применения в медицинской практике из-за цитотоксичности в отношении здоровых клеток.

Для установления таксономического положения штамма 31Z-6 использовали полифазный таксономический подход, включающий анализ комплекса как генетических, так и фенотипиче-

ских признаков. Сравнение нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК штамма 31Z-6 с последовательностями типовых представителей видов рода *Streptomyces* из базы данных GenBank выявило, что ближайшими видами со 100% сходством являются *S. rochei* DSM 40231^T и *S. mutabilis* DSM 40169^T. На филогенетическом древе они образуют вместе с 31Z-6 отдельную кладу с высоким уровнем бутстрап-поддержки (рис. 2). По морфологическим и физиолого-биохимическим признакам эти виды очень близки, поэтому для их разграничения необходим полногеномный анализ. По культуральным признакам (цвету и текстуре воздушного мицелия на ISP-средах) штамм 31Z-6 ближе к типовому *S. rochei* DSM 40231^T (табл. 2, рис. 3). Среди представителей вида *S. rochei* продуценты боррелидина обнаруживались неоднократно [11, 29, 31], есть данные о получении ацетилборрелидина В из культуры *S. mutabilis* [17]. Способность к синтезу данного антибиотика не ограничена строго определенным таксоном. Среди продуцентов боррелидина встречаются представители родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*, изолированные из различных местобитаний, включая эконишы с повышенной соленостью: океанические осадки, морские моллюски, мангровые отложения, засоленные почвы [10, 11, 18, 20, 23]. Предполагаем, что выделенный из грумисолей побережья оз. Кинерет продуцент боррелидина 31Z-6 принадлежит к виду *S. rochei*.

Ранее отмечено, что боррелидин может быть использован в защите растений для борьбы с *Phy-*

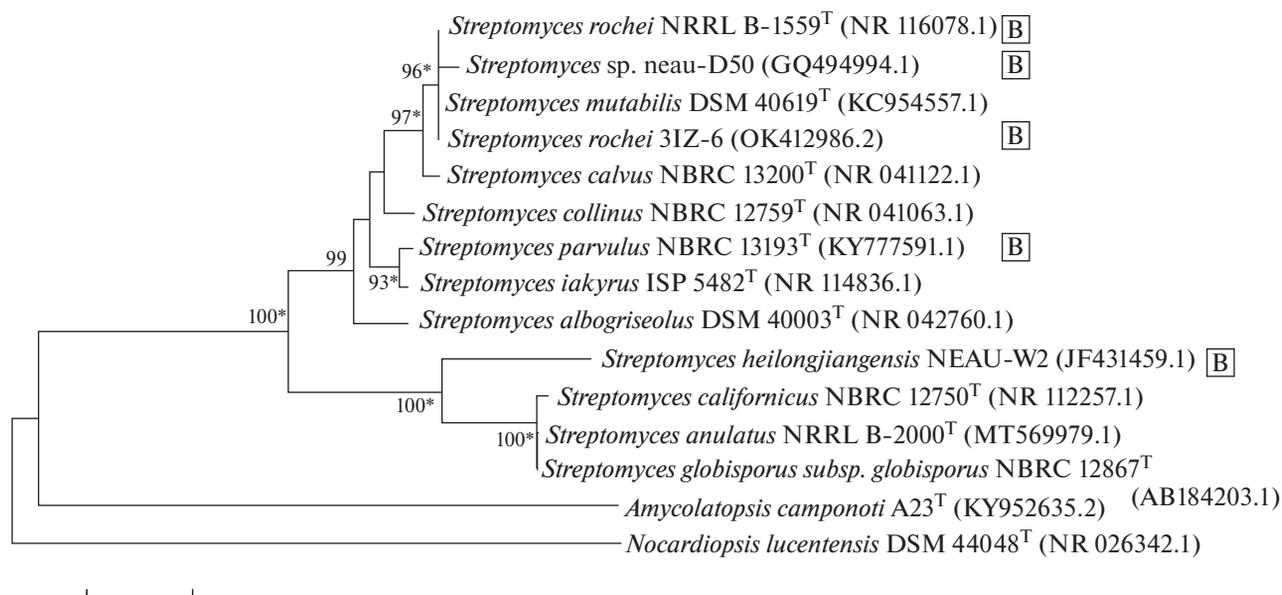


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма 3IZ-6 и наиболее близких ему генетически типовых штаммов стрептомицетов, на основании NJ-анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рПНК (в скобках указаны номера доступа последовательностей в GenBank). Указаны значения бутстрэп-анализа выше 60%. Масштаб соответствует одной замене на каждые 100 нуклеотидов. Знаком (*) отмечены ветви, также полученные с помощью ML-метода. Штамм *Nocardioopsis lucentensis* DSM 44048 выбран как референсный организм, не принадлежащий к роду *Streptomyces*. Штаммы, у которых показана способность продуцировать боррелидин, отмечены В.

tophthora sojae — возбудителем фитофтороза и стеблевой гнили сои (*Glycine max*) [15], а также против грибов *Pythium* sp. и *Phytophthora* sp., поражающих ряд важных сельскохозяйственных культур [14]. Результаты настоящих исследований показали способность штамма *S. rochei* 3IZ-6 подавлять рост почвообитающих фитопатогенных грибов *Fusarium solani*, *F. sambucinum*, *Botrytis cinerea* (рис. S6), вызывающих болезни у многих хозяйственно ценных видов растений.

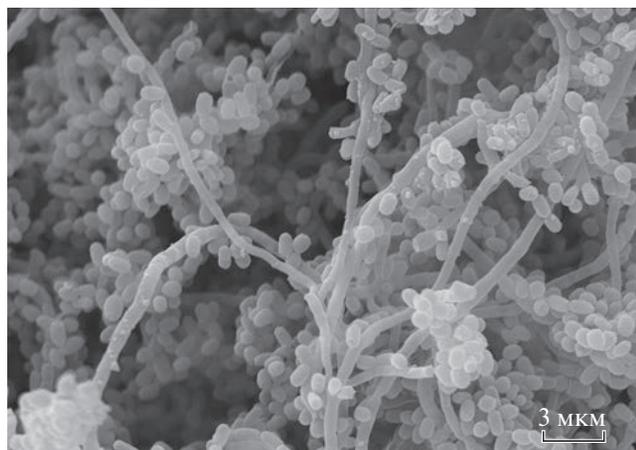


Рис. 3. Электронная микрофотография штамма 3IZ-6 на среде ISP 3 на 14 сут инкубации при 28°C.

В отношении фитопатогенов *Bipolaris sorokiniana*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata* не выявлено угнетающего действия агаровых блоков с культурой *S. rochei* 3IZ-6, но отмечено умеренное угнетение роста сапротрофного гриба *Trichoderma* sp. (13 мм). Установлено, что *S. rochei* 3IZ-6 способен подавлять рост некоторых фитопатогенных бактерий. Наиболее значительным было угнетение роста *Curtobacterium flaccumfaciens* G29r4 (40 мм). Данный фитопатоген может вызывать бактериальное увядание фасоли (*Phaseolus* spp.), гороха (*Pisum sativum*), сои и некоторых других бобовых культур. Рядом международных комиссий по карантину и защите растений возбудитель *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* включен в число карантинных объектов (<https://www.eppo.int>).

Фитотоксичность боррелидина впервые отмечена у *S. scabies*, но его угнетающее действие было на порядок ниже, чем такстомина А [13]. Оценка фитотоксического действия *S. rochei* 3IZ-6 показала, что водорастворимые метаболиты изолята снижают всхожесть обработанных семян пшеницы на 15, длину корней проростков — на 52, высоту побега — на 46, биомассу — на 48% по сравнению с растениями, не подвергнутыми обработке (табл. 3). Поскольку степень фитотоксичности *S. rochei* 3IZ-6 варьировала в зависимости от условий культивирования и состава питательной среды, теоретически представляется возможным подо-

Таблица 2. Культуральные, морфологические и физиологические признаки штамма 3IZ-6 и филогенетически близких видов стрептомицетов

Фенотипический признак	3IZ-6	<i>S. rochei</i> DSM 40231 ^T	<i>S. mutabilis</i> DSM 40169 ^T
Культуральные			
Цвет воздушного мицелия*	Серый*	Серый*	Светло-серый**
Цвет субстратного мицелия**	Бесцветный*	От бесцветного до серо-бурого	От желтовато-зеленого до серовато-фиолетового
Образование меланоидного пигмента**	Не образует	Не образует	Не образует
Морфологические			
Форма цепочек спор	Крючки, петли, короткие спирали (RA)***	Спиральные (S)	Крючки, петли, короткие спирали (RA)
Поверхность спор	Гладкая	Гладкая	Гладкая
Физиологические			
Максимальная концентрация NaCl, %	6	5	8
Диапазон pH	5–9	Нет	6–10
Диапазон температур, °C	4–45	Нет	25–40
Оптимальная температура, °C	38	30	37
Биохимические			
Гидролиз казеина	+	Нет	+
Гидролиз крахмала	+	Нет	+
Гидролиз КМЦ	+	Нет	Нет
Утилизирует углеводы	Арабиноза, галактоза, глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, рамноза, фруктоза	Глюкоза, рамноза, фруктоза	Арабиноза, глюкоза, маннитол, рамноза
Не использует углеводы	Инозитол, ксилоза, раффиноза, сахароза, сорбитол	Арабиноза, раффиноза, сахароза, ксилоза	Сорбитол
Чувствителен к антибиотикам, мкг	Str (300), Carb (25), Kan (30), Tet (30), PB (300)	Нет	Нет
Устойчив к антибиотикам, мкг	Ctx (30), Amx (20), Rif (5)****	Нет	Нет

* На плотных средах ISP 2–ISP 5.

** На ISP 6.

*** Форма спороносных гиф описана на ISP 3 на 14 сут роста при 28°C (рис. 3).

**** Str (стрептомицин), Carb (карбенициллин), Kan (канамицин), Tet (тетрацилин), PB (полимиксин В), Ctx (цефотаксим), Amx (амоксциллин), Rif (рифампицин).

Таблица 3. Всхожесть и морфометрические показатели проростков в зависимости от обработки семян КЖ *S. rochei* 3IZ-6

Вариант		Длина корня, мм	Высота побега, мм	Биомасса в.-с., г	Всхожесть, %
Контроль (без обработки)		89.78 ± 8.83*	35.5 ± 4.13	0.25 ± 0.01	87 ± 3.83
КЖ, полученная на ISP 3	Нативная	43.13 ± 4.03**	19.07 ± 3.04**	0.13 ± 0.01**	72 ± 5.66**
	1 : 10	69.13 ± 7.56**	29.48 ± 3.76	0.21 ± 0.03**	84 ± 5.66
КЖ, полученная на среде Гаузе 1	Нативная	71.88 ± 7.03**	32.15 ± 3.28	0.20 ± 0.02**	87 ± 6.0
	1 : 10	94.16 ± 10.28	45.04 ± 6.88	0.26 ± 0.02	93 ± 3.83

* Указаны средние значения и их стандартные отклонения (после знака ±), объем выборки n = 100.

** Различие с контролем достоверно при p ≥ 0.95.

брать оптимальные параметры, обеспечивающие желаемую гербицидную активность данной культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из грумусолей, сформированных в специфических условиях, связанных с закономерным сезонным чередованием продолжительных сухих и коротких влажных периодов, с использованием селективного приема получено 26 изолятов бактерий рода *Streptomyces*. В результате проведения антибиотического скрининга выделенных культур стрептомицетов выявлен штамм *S. rochei* 3IZ-6, содержащий, по данным репортерной флуоресцентной системы, ингибитор белкового синтеза, который с помощью постановки реакции *in vitro* трансляции, toe-print анализа и масс-спектрометрии идентифицирован как боррелидин. Антибиотик боррелидин и его дериваты в настоящее время интенсивно изучаются в связи с разработкой новых противораковых средств. Особый интерес представляет способность боррелидина ингибировать активность фермента треонил-тРНК-синтазы, принимающего участие в синтезе белка. Исследования почвенного изолята *S. rochei* 3IZ-6 в качестве нового продуцента боррелидина является приоритетным направлением.

Вместе с тем в чистых культурах *S. rochei* 3IZ-6 продемонстрировал угнетающее действие в отношении почвообитающих фитопатогенных грибов *F. solani*, *F. sambucinum*, *B. cinerea* и бактерии *C. flaccumfaciens*, имеющих широких круг растений-хозяев из числа сельскохозяйственных культур. Так, перечисленные возбудители отличаются высокой вредоносностью в отношении зернобобовых, тыквенных, томата, перца и ряда других овощных и полевых культур, возделываемых в разнообразных почвенных условиях.

Наряду с антифитопатогенным действием, в лабораторных условиях установлена выраженная фитотоксичность водорастворимых метаболитов *S. rochei* 3IZ-6, в связи с чем целесообразно проведение исследований, связанных с разработкой на его основе препарата гербицидного действия. Представленные в работе данные свидетельствуют о перспективности использования выделенного из грумусоли побережья оз. Кинерет изолята в защите растений от фитопатогенов и сорняков.

БЛАГОДАРНОСТЬ

И.Г. Широких, А.А. Широких, Я.И. Назарова, Н.А. Боков благодарят ФГБНУ Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого за поддержку в рамках осуществления государственного задания № FNWE-2022-0005.

Ю.В. Закалюкина благодарит Министерство науки и высшего образования Российской Федерации за поддержку в рамках проекта № 075-15-2021-1396.

Исследование ультраструктуры поверхности штамма 3IZ-6 проведено в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00278.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Рис. S1. Место отбора проб на западном берегу оз. Кинерет (Нижняя Галилея, Израиль) под злаковым разнотравьем.

Рис. S2. Способность штамма 3IZ-6 образовывать кислоту при росте на среде с различными источниками углерода.

Рис. S3. Индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или репликации ДНК.

Рис. S4. *In vitro* трансляция в системе на основе лизата *E. coli* (Promega).

Рис. S5. Схема toe-print анализа на матрице RST1.

Рис. S6. Рост фитопатогенных грибов отдельно и в присутствии штамма *S. rochei* 3IZ-6: *Fusarium solani* F-819, *Botrytis cinerea* F-4549, *Fusarium sambucinum* F-842, *Alternaria radicina* F-1843, *Alternaria solani* F-3048, *Rhizoctonia solani* F-2935 (картофельно-декстрозный агар, 10 сут).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов: роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.
2. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 256 с.
3. Кожевникова И.А., Швейкина В.И. Моделирование колебаний уровня озера Кинерет // Водные ресурсы. 2014. Т. 41. № 6. С. 565–572.
4. Озиранский Ю.С., Кольмакова Е.Г., Марголина И.Л. Интегрированное управление ограниченными водными ресурсами в целях устойчивого водообеспечения аридных регионов (опыт государства Израиль // Аридные экосистемы. 2014. Т. 20. № 4(61). С. 57–65.
5. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. София-М.: Пенсофт, 2005. 175 с.
6. Шапиро М.Б. Почвы Израиля // Почвоведение. 2006. № 11. С. 1300–1307.

7. *Alferova V.A., Maviza T.P., Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V., Lukianov D.A., Skvortsov D.A., Osterman I.A.* Biological evaluation and spectral characterization of a novel tetracenomyacin X congener // *Biochimie*. 2022. V. 192. P. 63–71.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.09.014>
8. *Atlas R.M.* Handbook of microbiological media. CRC Press, 2004. 2056 p.
9. *Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V.* Chemical ecology of streptomycetes albidoflavus strain a10 associated with carpenter ant camponotus vagus // *Microorganisms*. 2020. V. 8. № 12. P. 1948.
10. *Belimov A.A., Dietz K.-J.* Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // *Microbiol. Res.* 2000. V. 155. № 2. P. 113–121.
[https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80046-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80046-4)
11. *Berger J., Jampolsky L.M., Goldberg M.W.* Borrelidin, a new antibiotic with antiborrelia activity and penicillin enhancement properties // *Arch. Biochem.* 1949. V. 22. № 3. P. 476–478.
12. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. V. 5. The Actinobacteria. Part A. / Eds. M. Goodfellow et al. N.Y.: Springer, 2012. 2083 p.
13. *Cao Z., Khodakaramian G., Arakawa K., Kinashi H.* Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. V. 76. № 2. P. 353–357.
<https://doi.org/10.1271/bbb.110799>
14. *Chen Y.-Y., Chen P.-C., Tsay T.-T.* The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici* // *Biol. Control*. 2016. V. 98. C. 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
15. *Gao Y.-M., Gao Y.M., Wang X.J., Zhang J., Li M., Liu C.X., An J., Xiang W. S.* Borrelidin, a potent antifungal agent: insight into the antifungal mechanism against *Phytophthora sojae* // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. № 39. P. 9874–9881.
<https://doi.org/10.1021/jf302857x>
16. *Habibi D., Ogloff N., Jalili R. B., Yost A., Weng A.P., Ghahar, A., Ong C.J.* Borrelidin, a small molecule nitrile-containing macrolide inhibitor of threonyl-tRNA synthetase, is a potent inducer of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia // *Invest New Drugs*. 2012. V. 30. № 4. P. 1361–1370.
<https://doi.org/10.1007/s10637-011-9700-y>
17. *Hamed A., Abdel-Razek A.S., Frese M., Wibberg D., El-Haddad A.F., Ibrahim T.M., Kalinowski J. et al.* N-Acetylborrelidin B: a new bioactive metabolite from *Streptomyces mutabilis* sp. MII // *Z Naturforsch C*. 2018. V. 73. № 1–2. P. 49–57.
<https://doi.org/10.1515/znc-2017-0140>
18. *Hazan N., Stein M., Agnon A., Marco S., Nadel D., Negendank J. F., Neev D.* The late Quaternary limnological history of Lake Kinneret (Sea of Galilee), Israel // *Quat. Res.* 2005. V. 63. № 1. P. 60–77.
<https://doi.org/10.1016/j.yqres.2004.09.004>
19. *Li M., Zhang J., Liu C., Fang B., Wang X., Xiang W.* Identification of borrelidin binding site on threonyl-tRNA synthetase // *BBRC*. 2014. V. 451. № 4. P. 485–490.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.100>
20. *Lumb M., Macey P.E., Spyvee J., Whitmarsh J.M., Wright R.D.* Isolation of Vivomycin and Borrelidin, Two Antibiotics with Anti-Viral Activity, from a Species of *Streptomyces* (C2989) // *Nature*. 1965. V. 206. № 4981. P. 263–265.
<https://doi.org/10.1038/206263a0>
21. *Olano C., Moss S J., Braña A.F., Sheridan R.M., Math V., Weston A.J., Salas J.A.* Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: insights into nitrile formation† // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 52. № 6. P. 1745–1756.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04090.x>
22. *Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M.M., Liu H., Ochabowicz A., Mankin A.S.* Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 12. P. 5994–6004.
<http://aac.asm.org/content/57/12/5994>
23. *Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Dontsova O.A.* Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02117-16>
24. *Otoguro K., Ui H., Ishiyama A., Kobayashi M., Togashi H., Takahashi Y., Masuma R. et al.* In Vitro and in Vivo Antimalarial Activities of a Non-glycosidic 18-Membered Macrolide Antibiotic, Borrelidin, against Drug-resistant Strains of Plasmodia // *J. Antibiot.* 2003. V. 56. № 8. P. 727–729.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.727>
25. *Rai R.V., Bai J.A.* Natural Products from Actinomycetes: Diversity, Ecology and Drug Discovery. Mysore, Karnataka, India, 2022. 512 p.
<https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7>
26. *Shiryaev D.I., Sofronova A.A., Berdnikovich E.A., Lukyanov D.A., Komarova E.S., Marina V.I., Dontsova O.A.* Nybomycin inhibits both fluoroquinolone-sensitive and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* DNA gyrase // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021. V. 65. № 5. P. e00777-20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00777-20>
27. *Shirling E.B., Gottlieb D.* Methods for characterization of Streptomyces species // *Int. J. Syst. Bact.* 1966. V. 16. № 3. P. 313–340.
28. *Singer A.* The Soils of Israel. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007. 306 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-71734-8>
29. *Sun J., Shao J., Sun C., Song Y., Li Q., Lu L., Ju J.* Borrelidins F–I, cytotoxic and cell migration inhibiting agents from mangrove-derived *Streptomyces rochei* SCSIO ZJ89 // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26 № 8. P. 1488–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.010>
30. *Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A. et al.* Mechanism-Based Approach to New Antibiotic Producers Screening among Actinomycetes in the Course of the Citizen Science Project // *Antibiotics*. 2022. V. 9.

- № 11. P. 1198.
<https://doi.org/10.20944/preprints202208.0132.v1>
31. Yu M., Li Y., Banakar S. P., Liu L., Shao C., Li Z., Wang C. New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinochrysiella similis* 35 // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 915.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00915>
32. Zakalyukina Y.V., Osterman I.A., Wolf J., Neumann-Schaal M., Nouioui I., Biryukov M.V. *Amycolatopsis camponoti* sp. nov., new tetracenomycin-producing actinomycete isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. № 4. P. 533–544.
<https://doi.org/10.1007/s10482-022-01716-w>
33. Zakalyukina Y.V., Zaytsev A.R., Biryukov M.V. Study of Cellulose-Destroying Activity of Actinobacteria Associated with Ants // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2021. V. 76. № 1. P. 20–27.
<https://doi.org/10.3103/S0096392521010065>
34. European Soil Data Centre [Электронный ресурс]. URL: https://esdac.jrc.ec.europa.eu/images/Eudasm/Asia/images/maps/download/IL3002_SO.jpg

Biocontrol Potential of Novel Borrelidin-Producing *Streptomyces rochei* 3IZ-6 Isolated from Israeli Soil

I. G. Shirokikh¹, I. A. Osterman^{2, 3}, D. A. Lukianov^{2, 3}, V. I. Marina^{2, 3}, M. V. Biryukov², O. A. Belozeroва⁴, E. B. Guglya^{4, 5}, A. A. Shirokikh¹, Ya. I. Nazarova¹, N. A. Bokov¹, and Yu. V. Zakalyukina^{2, *}

¹Rudnitsky Federal Agricultural Research Center of the North-East, Kirov, 610007 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Skolkovo Institute of Science and Technology, Center of Life Sciences, Moscow, 121205 Russia

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: juline@soil.msu.ru

The soil actinobiota of various climatic zones are a rich source of bioactive natural products, including novel drugs. A complex of soil actinomycetes in the upper horizon of the grumusols (Vertisols) on the western coast of Lake Kinneret in the vicinity of Tiberias (Lower Galilee, Israel) was studied. The screening of the antagonistic activity of 26 isolates using on a dual reporter system revealed the bacterial strain 3IZ-6, which had the ability to inhibit protein synthesis. Strain 3IZ-6 was assigned to *Streptomyces rochei* by polyphase taxonomy approach. The active substance of *S. rochei* 3IZ-6 was isolated and purified using solid-phase extraction and HPLC. Toe-print analysis and mass spectrometry data allowed to establish, that active compound is a known inhibitor of protein biosynthesis, borrelidin. *S. rochei* 3IZ-6 can be used as a producer of borrelidin in biocontrol against phytopathogens and weeds.

Keywords: *Vertisols*, soil actinomycete, antibiotics screening, antiphytopathogen activity

ВЛИЯНИЕ ГЛИФОСАТА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ФИТОТОКСИЧНОСТЬ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ В УСЛОВИЯХ КРАТКОСРОЧНОГО МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

© 2023 г. Н. В. Костина^а *, М. В. Горленко^а, К. А. Мазуров^а, О. И. Филиппова^а,
И. В. Плющенко^а, И. А. Родин^а, Н. А. Куликова^{а, б}

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^бИнститут биохимии РАН им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Ленинский пр-т, 33, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nvkostina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

В модельном лабораторном эксперименте с пахотным горизонтом дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol (Loamic)), имеющим низкое содержание органического вещества и низкую биологическую активность, установлено, что внесение глифосата приводит к кратковременному изменению интенсивности основных процессов микробной трансформации азота в почве. При инкубировании почвы с глифосатом в максимальной рекомендуемой дозе 8 л/га в течение 22 сут наблюдается рост азотфиксирующей и денитрифицирующей активности на 30–80 и 300% и снижение процесса нитрификации на 20–40%. Эффекты носят кратковременный характер и не отражают всего комплекса протекающих микробиологических процессов: на эмиссию CO₂, являющегося интегральным показателем биологической активности, влияния глифосата не обнаружено. В конце инкубирования в почве с внесенным глифосатом отмечен рост численности бактерий на 40% и снижение численности микромицетов на 70%. В целом в выбранных условиях внесение глифосата привело к выраженному снижению биологической активности почвы по сравнению с контролем. Изучение функционального биоразнообразия почвенных микробных сообществ методом мультисубстратного тестирования показало, что под действием гербицида происходит снижение устойчивости почвенного микробного сообщества, выражающееся в увеличении значения коэффициента рангового распределения спектров потребления субстратов *d*, сопровождающееся уменьшением удельной метаболической работы *W* и интегрального индекса витальности *G*. Впервые показано, что при внесении глифосата в почву с низкой биологической активностью и обеспеченностью доступным фосфором наблюдается выраженное отрицательное действие препарата на почвенные микроорганизмы, что приводит к угнетению роста растений пшеницы.

Ключевые слова: раундап, функциональное биоразнообразие микробных сообществ, токсичность, биотестирование

DOI: 10.31857/S0032180X22601293, **EDN:** IEVLQD

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время гербицид глифосат (N-(фосфонометил)-глицин) широко применяется во всем мире. В России доля посевных площадей, обрабатываемых препаратами на основе глифосата, варьирует в диапазоне от 10 до 30%. Согласно заключению экспертов, в нашей стране на сегодняшний день нет каких-либо предпосылок снижения объемов потребления глифосата, как законодательных, так и рыночных. В краткосрочной перспективе возможен даже рост его использования вследствие ввода новых площадей в сельскохозяйственный оборот [10]. Общепринятым является мнение, что в почве глифосат быстро

инактивируется из-за связывания с глинистыми частицами, а также железом и алюминием в составе оксидов и гидроксидов [14]. Кроме того, микроорганизмы могут его использовать в качестве источника азота (биодеградация с разрывом связи C–N) или фосфора (биодеградация с разрывом связи C–P) [42]. Тем не менее, недавние исследования показывают, что существует опасность отрицательного последствия глифосата на рост сельскохозяйственных культур [21, 23, 42].

Среди причин последствия глифосата в большинстве случаев рассматривают накопление в почвах остаточных количеств гербицида или его наиболее часто встречающегося метаболита — амина-

метилфосфоновой кислоты (АМФК). АМФК, образуемая при деградации глифосата с разрывом связи С–N, представляет собой структурный аналог антибиотиков группы производных фосфоновой кислоты, ингибирует развитие бактерий путем нарушения синтеза клеточной стенки [13] и обладает фитотоксичностью [22]. Преимущественная деградация глифосата с образованием АМФК широко распространена в пахотных почвах, что связано с присутствием в них легкодоступных источников фосфора, вносимых с удобрениями, в то время как микробиологическое разрушение связи С–P наблюдается только в условиях низкой концентрации доступных фосфатов [19]. Оценка содержания глифосата и АМФК в пахотном горизонте почв Европейского союза показала, что почти в 50% случаев в почвах обнаруживается гербицид или его метаболит. Из 317 исследованных образцов 21% содержали глифосат, а 42% – АМФК. Максимальное содержание глифосата и АМФК достигало 2.05 мг/кг почвы и 1.92 мг/кг соответственно [39]. Оба соединения могут оказывать негативное действие на рост и развитие сельскохозяйственных культур [21, 22, 24] и высвобождаться из комплексов с почвенными минералами при внесении фосфорных удобрений [32].

В полевых экспериментах установлено, что при посеве фасоли, овса и рапса в почву через 14 сут после внесения глифосата в дозе 3 кг/га, соответствующей максимальной рекомендуемой, наблюдается задержка прорастания семян этих культур [23]. В работе [21] показано, что остаточные количества глифосата (доза внесения составила 3 кг/га, посев проводили через 24 сут после внесения гербицида) снижают в растениях овса уровень фитогормонов, биосинтез которых вовлекает использование хоризмат в качестве предшественника (индол-3-уксусная кислота, фенилуксусная кислота). Наблюдаемый эффект объясняется механизмом действия глифосата – ингибированием 5-энолпирувил-шикимат-3-фосфат синтазы (ЕПШФ синтаза, ЕС 2.5.1.19), являющейся компонентом ферментной системы шикиматного пути биосинтеза ароматических аминокислот и осуществляющего превращение шикимата в хоризмат – предшественник фенилаланина, тирозина и триптофана. Фитотоксичность АМФК также была неоднократно показана: установлено, что она ингибирует биосинтез хлорофилла и нарушает проводимость устьиц [22]. Таким образом, и глифосат в остаточных количествах, и АМФК токсичны для растений.

С другой стороны, многочисленными исследованиями показано, что внесение глифосата в почву может приводить к нарушениям функционирования почвенных микробных сообществ, таким как снижение численности ризосферных бактерий и грибов [34]. Это связано в первую оче-

редь с присутствием у некоторых микроорганизмов ЕПШФ синтазы, чувствительных к действию глифосата. В частности, наличие ЕПШФ синтазы, чувствительной к ингибированию глифосатом шикиматного пути биосинтеза ароматических аминокислот, экспериментально показано для почвенных бактерий *Bradyrhizobium japonicum* [43] и некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas* [12]. Согласно проведенным биоинформатическим оценкам, 82% видов архей и 57% видов бактерий имеют чувствительные к глифосату ЕПШФ синтазы, т.е. большинство прокариот может угнетаться глифосатом [30]. Изменения в составе микробного сообщества впоследствии оказывают влияние на экологические функции микроорганизмов в почве, включая круговорот биофильных элементов, образование почвенных агрегатов и биодеградацию органических соединений. Следовательно, воздействие на микроорганизмы отражается на плодородии почвы и урожайности сельскохозяйственных культур [24]. Особенно актуальным это является для почв с низким содержанием биофильных элементов и органического вещества, характеризующихся низким уровнем биологической активности.

Цель работы – оценить влияние глифосата на активность почвенных микроорганизмов и фитотоксичность почвы в условиях пахотной почвы с низким содержанием питательных элементов и органического вещества, в том числе доступных фосфатов. Согласно существующим данным, наиболее чувствительными к токсическому действию глифосата являются микроорганизмы, участвующие в процессах превращения азота [26]. Поэтому в рамках исследования была проведена оценка влияния глифосата на азотфиксирующую, нитрифицирующую и денитрифицирующую активность почвы. Для получения интегральных оценок воздействия глифосата на почвенные микроорганизмы использовали определение эмиссии углекислого газа и общей численности микроорганизмов, а для определения функционального биоразнообразия и устойчивости почвенных микробных сообществ – метод мультисубстратного тестирования (МСТ). Оценку фитотоксичности проводили методом биотестирования с использованием в качестве тест-культуры растений пшеницы. Для определения пути преимущественной биодеградации гербицида в почве определяли содержание глифосата и АМФК.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Образцы дерново-подзолистой почвы (соответствует Albic Retisol по WRB) отбирали в Ногинском районе Московской области (55°48.173' N, 38°14.908' E) из пахотного горизонта почвы с глубины 0–20 см. Из пяти индивидуальных образцов, отобранных методом конверта на площадке

площадью около 1 м², составляли объединенную пробу, из которой получали средний образец [1]. Актуальную кислотность и содержание подвижных форм калия и фосфора методом Кирсанова в модификации ЦИНАО определяли согласно [1], содержание С и N – каталитическим сжиганием при 960°C в токе кислорода [25] на элементном анализаторе Vario Macro Cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия); содержание подвижных форм азота – согласно [27]. Общая характеристика почвы: рН_{H₂O} 5.3; содержание органического углерода С 1.83%; общее содержание азота N 0.12%; содержание обменного калия К₂O 46 мг/кг почвы; содержание подвижного фосфора Р₂O₅ 175 мг/кг; содержание нитратов и аммония 2.9 и 40.6 мг/кг соответственно. Почву можно охарактеризовать как слабокислую, с низкой обеспеченностью подвижными фосфатами и обменным калием, очень низкой обеспеченностью нитратами и средней – суммарным количеством нитратов и аммония.

Влияние глифосата на микробиологические процессы оценивали с помощью модельного лабораторного эксперимента. Для этого почву высушивали и просеивали через сито 2 мм, предварительно удалив остатки корней. Далее навески почвы (100.00 ± 0.02) г помещали в пластиковые вегетационные сосуды объемом 100 см³. Глифосат (Раундап ВР 360 г/л, АО “Август”, РФ) вносили в виде водного раствора до влажности почвы, соответствующей 70% наименьшей влагоемкости (НВ). Начальное содержание гербицида в почве было 9.6 мг/кг, что соответствует дозе внесения 8 л/га (2.88 кг/га по действующему веществу). Выбор концентрации глифосата был основан на максимальной рекомендуемой дозе внесения 8 л/га и предположения, что весь гербицид удерживается в верхнем слое почвы 2–5 см [15]. В контрольные сосуды с почвой вносили такой же объем дистиллированной воды. Для инкубирования сосуды помещали в термостат при температуре (24 ± 2)°C. Поддержание 70% НВ проводили путем периодического взвешивания сосудов и внесения необходимого количества воды. Повторность трехкратная. Через 1, 8, 15 и 22 сут часть сосудов извлекали для определения содержания глифосата и его основного метаболита – АМФК. Влияние на микробное сообщество оценивали на 1, 8, 15 и 22 сут эксперимента на основании определения азотфиксирующей, нитрифицирующей и денитрифицирующей активности, эмиссии углекислого газа, общей численности микроорганизмов и функционального разнообразия микроорганизмов методом МСТ. Кроме того, оценивали фитотоксичность почвы по отношению к растениям пшеницы.

Определение азотфиксирующей активности проводили ацетиленовым методом согласно [7], ос-

нованном на способности нитрогеназы азотфиксирующих микроорганизмов восстанавливать ацетилен С₂H₂ до этилена С₂H₄. Для определения актуальной азотфиксации навески почвы 5 г помещали в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл, флаконы укупоривали резиновой пробкой, вводили 1 мл ацетилена и инкубировали в термостате при постоянной температуре 28°C в течение 1 сут. После этого производили измерения образовавшегося этилена. Для определения потенциальной азотфиксации, навески почвы 5 г помещали в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл и вносили раствор глюкозы в расчете 1% глюкозы от массы воздушно-сухой почвы. Далее почву перемешивали стеклянной палочкой для равномерного распределения глюкозы, флаконы закрывали ватной пробкой и помещали в термостат при температуре 28°C на 1 сут. Затем флаконы укупоривали резиновой пробкой, вводили 1 мл ацетилена и инкубировали в термостате при 28°C в течение 1 ч. Определение образовавшегося этилена проводили на хроматографе Кристалл-2000 (Хроматэк, РФ), оборудованном колонкой Porapak N 80/100 (1 м × 3 мм) и пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Условия определения: температура колонки 60°C, температура детектора 160°C, температура испарителя 100°C, расход газа-носителя (N₂) 50 мл/мин, воздуха 280 мл/мин, водорода 28 мл/мин. Определение проводили в трехкратной повторности.

Определение нитрифицирующей активности по Кравкову проводили согласно [27]. Навески почвы 5 г инкубировали (влажность 60% НВ, 28°C) в течение 8 сут, после чего проводили определение свободных NO₃⁻-ионов согласно [9]. В пробирку, содержащую 5 г почвы после инкубирования, приливали 12.5 мл 0.25 М раствора Mg(CH₃COO)₂, взбалтывали перемешиванием со скоростью 25 об./мин в течение 1 ч на встряхивателе Intelli-Mixer (ELMI, Латвия), центрифугировали при 2000 об./мин (760g) в течение 15 мин в центрифуге CM-6M (ELMI, Латвия). В центрифугате при помощи ион-селективного электрода Эком-NO₃ и иономера Экотест-120 (НПП “Эконикс”, РФ) измеряли содержание азота в нитратной форме. В случае определения потенциальной нитрифицирующей способности перед началом инкубирования в почву вносили (NH₄)₂SO₄ (0.2 г/кг). Повторность трехкратная.

Определение денитрифицирующей активности проводили по методу Федоровой, основанному на способности ацетилена ингибировать редуктазу закиси азота N₂O, что позволяет оценивать активность процесса денитрификации по накоплению N₂O в газовой фазе [7]. Для определения актуальной денитрификации навеску почвы 5 г помещали в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл, герметично закрывали резиновыми пробками и в

течение 1 мин продували аргоном. Далее вводили 1 мл ацетилена и инкубировали при температуре 28°C в течение 5 сут. Измерение концентрации N₂O проводили на газовом хроматографе Кристалл-2000 (Хроматэк, РФ), оборудованном колонкой Porapak N 80/100 (1 м × 3 мм) и детектором электронного захвата (ДЭЗ). Условия определения: расход газа-носителя (азот) 90 мл/мин, температура детектора 240°C, температура колонки 50°C, испарителя 100°C. Определение потенциальной денитрификации проводили аналогично, но с внесением в почву перед началом инкубирования глюкозы (2.5 мг/г) и нитрата калия KNO₃ (0.3 мг/г) и сокращением времени инкубирования до 1 сут. Повторность трехкратная.

Определение эмиссии углекислого газа проводили согласно [7]. Для определения актуальной эмиссии CO₂ навеску почвы 2 г помещали в пенициллиновые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и проводили инкубирование в течение 1 сут при температуре 28°C. Далее определяли содержание CO₂ на газовом хроматографе 3700 (ОАО “Хроматограф”, РФ) с колонкой Полисорб-1 (3 м × 3 мм) и детектором по теплопроводности. Условия определения: температура испарителя 30°C, температура катарометра 100°C, измерительных элементов 150°C, сила тока 148 мА, расход газа-носителя (гелия) 30 мл/мин. Для оценки потенциальной эмиссии CO₂ перед началом инкубирования в почву вносили глюкозу из расчета 2.5 мг/г. Повторность трехкратная.

Определение общей численности микроорганизмов проводили методом люминесцентной микроскопии в падающем свете с окрашиванием акридином оранжевым [5]. Водно-почвенные суспензии (1 : 10) обрабатывали на ультразвуковом диспергаторе Sonopuls (Bandelin, ФРГ) (22 кГц, 0.44 А, 2 мин). Далее микропипеткой наносили по 0.01 мл суспензии на обезжиренные предметные стекла и равномерно распределяли ее петлей на площади 4 см². После полного высыхания капли препарат фиксировали легким нагреванием на пламени горелки. Препараты для учета микроорганизмов окрашивали раствором акридина оранжевого (1 : 10000) в течение 2–3 мин. Прямое микроскопирование препаратов проводили на микроскопе Axioskop 2+ (Carl Zeiss, Швейцария). На каждом мазке просматривали по 50–100 полей зрения. На основании полученных данных оценивали общую численность бактерий и длину мицелия грибов. Повторность трехкратная.

Определение функционального разнообразия микроорганизмов методом МСТ проводили в соответствии с МВИ № 13-06 “Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест-субстратов микробным сообществом почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом” [4], основанном на анализе потребления изучаемым

микробным сообществом 47 органических моно-субстратов различных номинальных групп (сахара, спирты, соли органических кислот, азотсодержащие органические соединения и полимеры). Для экстракции микроорганизмов к 0.7 г смешанной пробы, получаемой путем смешивания 3 индивидуальных проб из каждого образца, добавляли 35 мл дистиллированной воды. Получаемые суспензии встряхивали в течение 1.5 мин при 3000 об./мин на орбитальном шейкере типа Vortex и затем центрифугировали в течение 2 мин при 2.2g. Полученный супернатант с внесенным индикатором роста микроорганизмов (тетразолий фиолетовый, восстанавливающийся при росте микроорганизмов до формазана) вносили в 96-луночный тест-планшет Эко-Лог, содержащий набор тест-субстратов. Заполненный планшет инкубировали в течение 3 сут при 28°C. После этого оценивали интенсивность потребления субстратов, определяя концентрацию формазана по поглощению при длине волны 510 нм на многоканальном фотометре Униплан (ЗАО “Пикон”, РФ). На основании данных по оптической плотности в ячейках с различными монособстратами рассчитывали среднюю интенсивность потребления субстратов различных номинальных групп. Кроме того, данные обрабатывали с помощью оригинального программного обеспечения ЭКОЛОГ, получая трехпараметрическую модель рангового распределения потребления субстратов почвенным микробным сообществом [4]. В качестве выходных параметров использовали коэффициент рангового распределения спектров потребления субстратов d , отражающий стабильность сообщества. Кроме того, оценивали индексы биоразнообразия микробного сообщества, такие как количество потребленных субстратов N ; удельная метаболическая работа сообщества W , соответствующая средней интенсивности потребления субстратов и интегральный индекс витальности G .

Содержание глифосата и АМФК определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Dionex, США) с диодно-матричным детектором и гибридного тандемного тройного квадрупольного масс-спектрометра Qtrap 3200 (ABSciex, Канада), оснащенного источником ионизации электрораспылением. Водную экстракцию гербицида и его основного метаболита осуществляли согласно [20], хроматографическое разделение и масс-спектрометрическое определение – согласно [17].

Фитотоксичность почвы оценивали с помощью лабораторно-вегетационного эксперимента. В сосуды с почвой помещали предварительно откалиброванные, стерилизованные и замоченные (24 ч, 24°C) семена пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. сорта Л-1, отбирая для посадки

только наклюнувшиеся семена. Для поверхностной стерилизации семена заливали на 30 мин 8%-ным раствором H_2O_2 , потом семена промывали 5–6 раз стерильной дистиллированной водой [33]. Посадку производили на глубину ~ 1 см, по 5 семян на 1 сосуд. Для выращивания сосуда с семенами помещали в вегетационную камеру на 21 сут (фотопериод 12 ч, 24°C). Полив проводили по мере необходимости. В конце опыта учитывали длину побегов и воздушно-сухой надземной биомассы. Повторность трехкратная.

Статистическая обработка результатов состояла в расчете среднего и стандартного отклонения. Сравнение средних для вариантов без внесения гербицида (контроль) и с внесением глифосата (глифосат) в каждый день пробоотбора проводили на основании однофакторного дисперсионного анализа при выбранном уровне доверительной вероятности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка содержания глифосата в почве (табл. 1) показала, что уже через сутки после внесения содержание гербицида снизилось от 9.6 мг/кг до 60 мкг/кг, а его наиболее часто встречающийся метаболит — АМФК — не обнаруживается. Полученные результаты совпадают с данными предыдущих исследований, также отмечавших быстрое исчезновение глифосата в почве после внесения вследствие его связывания по механизму лигандного обмена с почвенными оксидами и глинистыми минералами [14, 38]. Отсутствие АМФК в исследованных образцах может быть обусловлено связыванием этого метаболита с оксидами алюминия/железа или органическим веществом почвы, либо свидетельствовать о преимущественном разложении гербицида с расщеплением связи С–Р (саркозиновый путь), что обычно наблюдается в почвах с низким содержанием подвижного фосфора [6]. Это согласуется с низкой обеспеченностью использованной почвы подвижными фосфатами (175 мг/кг). При деградации по саркозиновому пути на первом этапе происходит образование саркозина (N-метилглицин) и неорганического фосфата PO_4^{3-} . Считается, что образующиеся метаболиты не токсичны и быстро утилизируются почвенными микроорганизмами: фосфаты используются как источник фосфора, а саркозин окисляется до глицина, разлагающегося до NH_3 и CO_2 , и формальдегида, идущего на образование комплекса с тетрагидрофолатом — коферментом метаболизма аминокислот и нуклеиновых кислот [14].

Наблюдаемое последующее дальнейшее снижение концентрации глифосата хорошо согласуется с ранее высказанными предположениями о возможности его утилизации различными груп-

Таблица 1. Динамика содержания глифосата в дерново-подзолистой почве в условиях модельного лабораторного эксперимента. Среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$)

Время после внесения глифосата, сут	Концентрация глифосата, мкг/кг
1	60 \pm 9.0
8	44 \pm 6.6
15	32 \pm 4.8
22	36 \pm 5.4

пами почвенных микроорганизмов [29, 31]. В ряде работ показано, что глифосат используется в качестве субстрата, в частности, α -протеобактериями [18] и γ -протеобактериями [34], следствием чего является увеличение их содержания в почве.

Результаты, отражающие влияние глифосата на интенсивность протекания азотфиксации, нитрификации и денитрификации, представлены в табл. 2. Видно, что показатели всех исследованных процессов трансформации азота были чрезвычайно невысокими. Это свидетельствует о низкой биологической активности использованной почвы, обусловленной, по-видимому, низким содержанием в ней органического вещества и основных биофильных элементов. В пользу этого говорит обнаруженное выраженное превышение потенциальной активности над актуальной. Для азотфиксации наблюдаемое превышение составило 8 раз и более, а для денитрификации — 26 раз и более. Исключением была нитрифицирующая активность, где обнаруженное максимальное превышение потенциальной активности над актуальной было 1.3. Скорее всего, наблюдаемые различия связаны с тем, что для инициации нитрификации вносили соль аммония, тогда как в случае азотфиксации и денитрификации с этой целью использовали глюкозу. Это указывает на то, что низкая биологическая активность почвы в данном случае была обусловлена, главным образом, низким содержанием легкодоступных источников углерода.

Через сутки после внесения глифосата был отмечен рост актуальной азотфиксации в 1.4 раза, а через 8 сут — в 1.8 раз по сравнению с контролем. Возможность положительного влияния глифосата на рост азотфиксирующих бактерий при внесении доз, соответствующих рекомендуемому, была ранее продемонстрирована на примере 24-часового выращивания *Azotobacter* sp. на среде Лоури–Бертрана в присутствии гербицида [11]. В остальные сроки пробоотбора значимого влияния глифосата ни на актуальную, ни на потенциальную азотфиксирующую активность почвы не отмечено. При этом динамика азотфиксирующей актив-

Таблица 2. Влияние глифосата на основные процессы микробиологической трансформации азота в дерново-подзолистой почве в условиях модельного лабораторного эксперимента

Инкубирование, сут	Активность			
	актуальная		потенциальная	
	контроль	глифосат	контроль	глифосат
	Азотфиксация, нг C ₂ H ₄ /(г ч)			
1	0.034 ± 0.005	0.047 ± 0.011*	0.40 ± 0.03	0.43 ± 0.04
8	0.023 ± 0.007	0.041 ± 0.001*	0.86 ± 0.03	0.79 ± 0.08
15	0.091 ± 0.038	0.070 ± 0.003	0.96 ± 0.06	0.90 ± 0.07
22	0.054 ± 0.002	0.052 ± 0.006	0.45 ± 0.31	0.60 ± 0.31
	Нитрификация, мкг N–NO ₃ ⁻ /(г ч)			
1	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001
8	0.120 ± 0.022	0.070 ± 0.033*	0.130 ± 0.023	0.076 ± 0.031*
15	0.206 ± 0.010	0.204 ± 0.018	0.251 ± 0.014	0.210 ± 0.018*
22	0.181 ± 0.013	0.182 ± 0.006	0.241 ± 0.025	0.218 ± 0.016
	Денитрификация, мкг N ₂ O/(г ч)			
1	0.006 ± 0.003	0.006 ± 0.005	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.2
8	0.077 ± 0.051	0.100 ± 0.022	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1
15	0.105 ± 0.055	0.107 ± 0.066	2.7 ± 0.3	2.5 ± 0.3
22	0.021 ± 0.026	0.064 ± 0.039*	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2

* Значимое отличие от контроля ($p = 0.05$).

ности в контрольной почве и почве с гербицидом имела сходный вид: рост в первые сутки инкубирования, сменяющийся снижением активности. Отсутствие влияния глифосата на активность азотфиксации при длительной экспозиции ранее показано в сходном эксперименте на дерново-подзолистой почве при дозах внесения 0.5–50.0 мг/кг и 45-суточном экспонировании [2]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что влияние глифосата на азотфиксирующие микроорганизмы проявляется в виде интенсификации этого процесса в первые дни после внесения. Скорее всего, это связано с быстрой утилизацией в почве образующегося аммония при деградации глифосата по саркозиновому пути, что не привело к возможному ингибированию нитрогеназной активности вследствие избытка ионов аммония в почве. Известно, что при внесении глифосата в дозах, значительно превышающих рекомендуемые, рост азотфиксирующих бактерий угнетается [11].

В отличие от азотфиксации, влияние гербицида на нитрифицирующую активность проявлялось позднее. На 8 сут почва с глифосатом имела более низкую нитрифицирующую активность, как актуальную, так и потенциальную, составляя только 59% от контрольных значений. Для потенциальной нитрификации статистически значимое ингибирование (до 84% от контроля) сохра-

нялось и на 15 сут. Негативное влияние глифосата на нитрификацию в почвах сельскохозяйственного использования ранее было продемонстрировано в некоторых работах [16, 45], хотя часто исследователи также отмечают стимулирующее действие гербицида [37] или отсутствие эффекта [40]. Видимо, определяющими факторами в направлении действия глифосата на нитрифицирующую активность являются особенности микробного сообщества почвы, а также история применения на ней глифосата и удобрений [36]. Известно, что в почвах, постоянно загрязняемых глифосатом, происходит развитие микробиома, устойчивого к токсическому действию гербицида. Показано, что обработка глифосатом может приводить к отбору микробных сообществ, способных эффективно метаболизировать аминовые субстраты, что объясняет стимулирующее действие гербицида [37]. Для использованной почвы, напротив, установлено, что внесение глифосата приводит к снижению активности использования азотсодержащих органических соединений (рис. 1), что может косвенно указывать на угнетение гетеротрофных нитрификаторов, преобладание которых обычно наблюдается в кислых почвах [8]. Согласно данным [45], внесение глифосата в кислую почву (рН_{H₂O} 5.0) приводило к снижению в ней количества копий генов *amoA*, отражающих обилие аммонийоксиляющих архей и бактерий, участву-

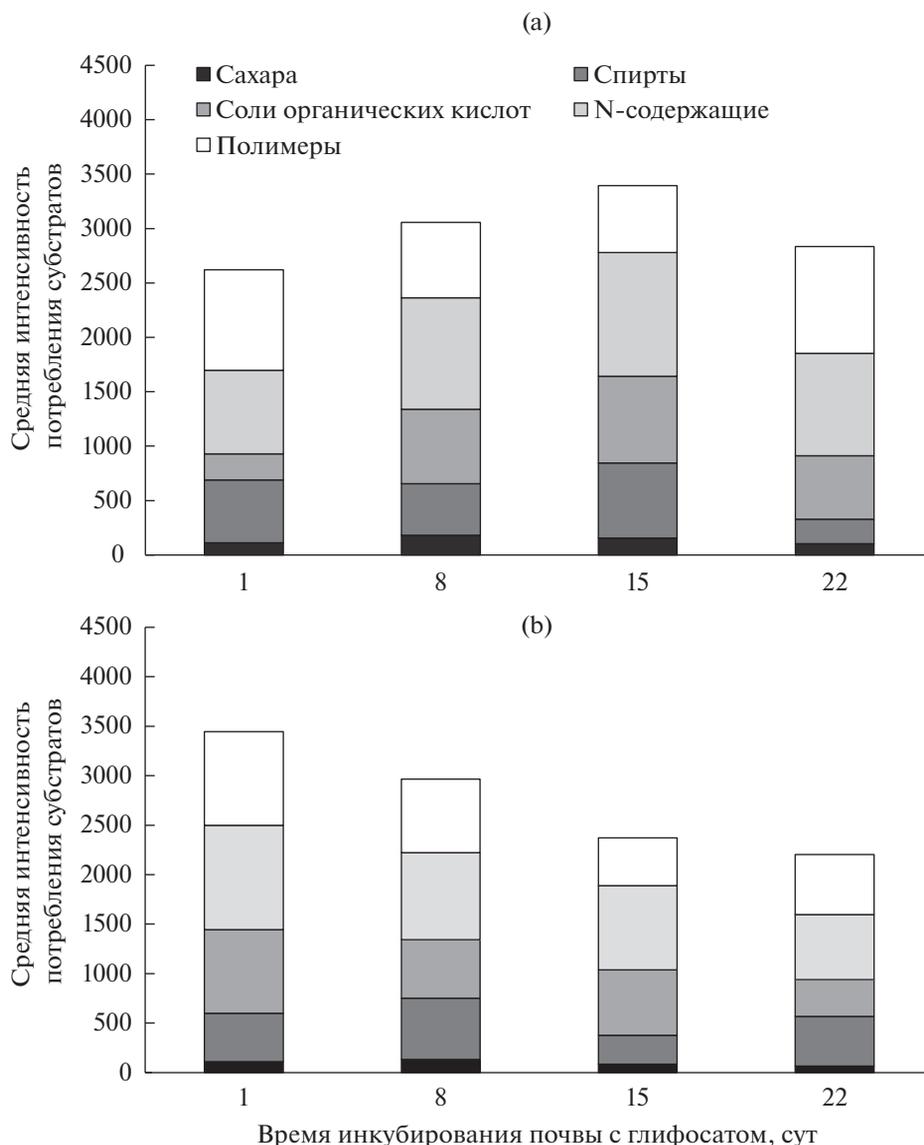


Рис. 1. Средняя интенсивность потребления субстратов различных номинальных групп по данным МСТ при отсутствии (а) и в присутствии глифосата (б).

ющих в процессе окисления аммиака — лимитирующей стадии нитрификации. Таким образом, для более полной оценки влияния глифосата на нитрифицирующую способность почвы необходимо отдельно изучать процесса автотрофной и гетеротрофной нитрификации, а также воздействие на отдельные стадии нитрификации.

Наиболее отдаленным эффект глифосата был на денитрификацию: актуальная денитрификация в присутствии глифосата была значимо выше (в 3 раза), чем в контрольном варианте только через 22 сут после внесения гербицида. Схожие эффекты стимулирования денитрификации часто отмечают исследователями [40, 41]. Видимо, наблюдаемый эффект усиления денитрификации

объясняется угнетением нитрификации, отмеченным на 8 и 15 сут после внесения глифосата и, как следствие, повышением в почве содержания доступных для восстановления нитратов. Несмотря на то, что потенциально усиление процесса денитрификации можно оценить как отрицательное действие глифосата на окружающую среду, так как N_2O является парниковым газом, можно ожидать, что этот эффект краткосрочный, потому что уже через 21 сут после внесения гербицида ингибирования нитрификации не отмечали. Высказанное предположение подтверждается сообщениями о том, что внесение глифосата не приводит к значимым изменениям эмиссии N_2O почвами или снижает ее [28].

Таблица 3. Влияние глифосата на функциональное разнообразие микроорганизмов дерново-подзолистой почвы в условиях модельного лабораторного эксперимента

Инкубирование, сут	Контроль				Глифосат			
	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>W</i>	<i>G</i>	<i>d</i>	<i>N</i>	<i>W</i>	<i>G</i>
1	1.33	21	1206	0.34	0.72	25	1529	0.74
8	1.45	28	1326	0.41	1.00	28	1212	0.60
15	1.49	34	1273	0.49	1.51	28	1051	0.40
22	1.17	24	1276	0.44	2.13	35	726	0.35

Примечание. *d* – коэффициент рангового распределения спектров потребления субстратов, *N* – количество потребленных субстратов; *W* – удельная метаболическая работа сообщества, соответствующая средней интенсивности потребления субстратов, и интегральный индекс витальности *G*.

В целом можно сказать, что ингибирующее действие глифосата на процессы трансформации азота в почве при внесении в рекомендуемых дозах было отмечено только для нитрификации, в то время как для процессов азотфиксации и денитрификации наблюдали стимуляцию под действием гербицида. При этом наблюдаемые эффекты имели краткосрочный характер, что может быть обусловлено быстрой минерализацией глифосата по саркозиновому пути, не сопровождающейся образованием токсичных метаболитов, таких как АМФК. Отсутствие выраженной односторонней тенденции влияния глифосата на процессы микробной трансформации азота, по видимому, обусловлено разнообразием возможных физиологических и экологических ответов почвенных микроорганизмов на применение гербицида, что ранее было показано рядом исследователей [2, 3, 31].

Анализ потребления изучаемым микробным сообществом органических моносубстратов различных номинальных групп методом МСТ также выявил разнонаправленность ответов на внесение глифосата (табл. 3). Динамика потребления сахаров была сходной в контрольной почве и почве с внесенным глифосатом: к 8 сут инкубирования происходил рост этого показателя, а затем – снижение. Видимо, обнаруженная тенденция в данном случае отражает обычно наблюдаемую динамику развития микробных сообществ в лабораторных условиях: первоначальный рост при “оживлении почвы”, сменяющийся снижением численности микроорганизмов при истощении в почве доступных субстратов. Динамика потребления полимеров, хотя и отличалась от динамики потребления сахаров, но имела сходный характер для изучаемых вариантов. После первоначального плавного снижения интенсивности их потребления, начиная с 15 сут инкубирования наблюдали интенсификацию этого процесса.

В случае азотсодержащих органических соединений, напротив, внесение глифосата привело к

принципиальному изменению динамики потребления этих субстратов. Если в контрольном варианте, аналогично потреблению сахаров, наблюдали рост этого показателя во времени с последующим снижением, то в присутствии гербицида – постоянное уменьшение. Обнаруженная динамика средней интенсивности потребления азотсодержащих субстратов совпадает с динамикой численности грибов в присутствии глифосата (табл. 4) и, возможно, свидетельствует об их значительной роли в процессе нитрификации в исследуемой почве. Известно, что органический азот является наиболее предпочтительным субстратом для нитрификации микромицетами, выделяемыми из дерново-подзолистых почв [8].

В целом микроорганизмы исследуемой почвы характеризовались неравномерностью потребления субстратов различных номинальных групп. Наименьшая средняя интенсивность потребления была обнаружена для сахаров и, в некоторые дни инкубирования, для спиртов (рис. 1а). С другой стороны, для микроорганизмов исследованной почвы наблюдали высокую активность среднего потребления азотсодержащих органических соединений и полимеров. Количество потребляемых субстратов *N* в почве контрольного варианта не превышало 34 из 47, что свидетельствует о неустойчивости сообщества и нашло отражение в рассчитанном высоком значении коэффициента *d*, характеризующего крутизну хвоста рангового распределения, и низкого – интегрального индекса витальности *G*. В процессе инкубирования наблюдали первоначальный рост удельной метаболической работы сообщества *W*, сменяющийся ее снижением, что совпадает с динамикой нитрификации и денитрификации в исследованной почве и соответствует обнаруженному преобладанию потребления азотсодержащих органических соединений.

Внесение глифосата привело к некоторому уменьшению коэффициента *d* в первую неделю инкубирования, однако в дальнейшем был отме-

Таблица 4. Влияние глифосата на общую численность микроорганизмов в дерново-подзолистой почве в условиях модельного лабораторного эксперимента

Инкубирование, сут	Бактерии, млрд кл/г		Грибы, м/г	
	контроль	глифосат	контроль	глифосат
1	3.2 ± 0.2	2.8 ± 0.1*	103 ± 15	97 ± 12
8	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1*	243 ± 15	63 ± 15*
15	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1*	150 ± 28	55 ± 7*
22	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1*	150 ± 14	45 ± 7*

* Значимое отличие от контроля ($p = 0.05$).

Таблица 5. Влияние глифосата на эмиссию углекислого газа дерново-подзолистой почвой в условиях модельного лабораторного эксперимента

Инкубирование, сут	Эмиссия CO ₂ , мкмоль/(г ч)			
	актуальная		потенциальная	
	контроль	глифосат	контроль	глифосат
1	4 ± 4	5 ± 10	24 ± 13	25 ± 11
8	3 ± 2	3 ± 2	25 ± 8	20 ± 10
15	2 ± 2	3.9 ± 0.9	40 ± 8	46 ± 18
22	2 ± 2	2.2 ± 0.3	33.2 ± 0.2	40 ± 16

чен резкий рост этого показателя до 2.13 при снижении удельной метаболической работы на 40% по сравнению с контролем. Это указывает на выраженное отрицательное действие глифосата на почвенные микроорганизмы через 21 сут после внесения.

Определение численности микроорганизмов показало, что более чувствительными к действию гербицида оказались почвенные грибы: начиная с 8 сут после внесения глифосата их численность была значимо ниже, чем в контрольном варианте и составляла не более 30–40% от контрольных значений. Численность бактерий, напротив, уменьшалась под действием глифосата только в первые дни после его внесения, а через 21 сут – превышала контрольные значения на 40%. Отмеченная тенденция совпадает с данными других исследователей, отмечавших рост бактерий, таких как протеобактерии, в присутствии глифосата в условиях, когда его разложение происходит преимущественно с разрывом связи С–Р [29]. Это объясняется тем, что среди микроорганизмов, способных разлагать глифосат (бактерии, грибы, микромицеты и актиномицеты), ключевая роль принадлежит в большинстве случаев бактериям [44].

Разнонаправленное влияние глифосата на численность почвенных бактерий и грибов привело к тому, что в целом внесение гербицида не влияло на суммарную эмиссию углекислого газа (табл. 5). Полученные данные согласуются с опубликованными результатами метаанализа 36 исследова-

ний, продемонстрировавшими отсутствие влияния глифосата на эмиссию CO₂ при внесении в рекомендуемых дозах [35].

Тем не менее, ухудшение биологических свойств почвы, обнаруживаемое методом МСТ, вызвало угнетение развития растений пшеницы на почве в присутствии глифосата. При выращивании растений на почве, инкубированной с гербицидом в течение 8–22 сут, было отмечено значимое снижение биомассы растений (рис. 2а). Длина растений, полученных на этой почве, составляла 73–92% от контрольных величин, однако это снижение не было статистически значимым (рис. 2б). Следует подчеркнуть, что угнетение растений наблюдали при отсутствии в почве АМФК и при минимальных концентрациях глифосата в почве (32–44 мг/кг), в то время как при более высоком содержании гербицида (60 мг/кг), длина и биомасса растений, выращенных на почве с глифосатом, не отличались от контрольных. Это указывает на то, что определяющую роль в данном случае играет именно ухудшение микробиологических свойств почвы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глифосат является одним из наиболее широко применяемых гербицидов. Несмотря на то, что многочисленными исследованиями показано его быстрое исчезновение из почвы вследствие связывания и биодеградации, в ряде работ продемонстрировано его отрицательное последствие

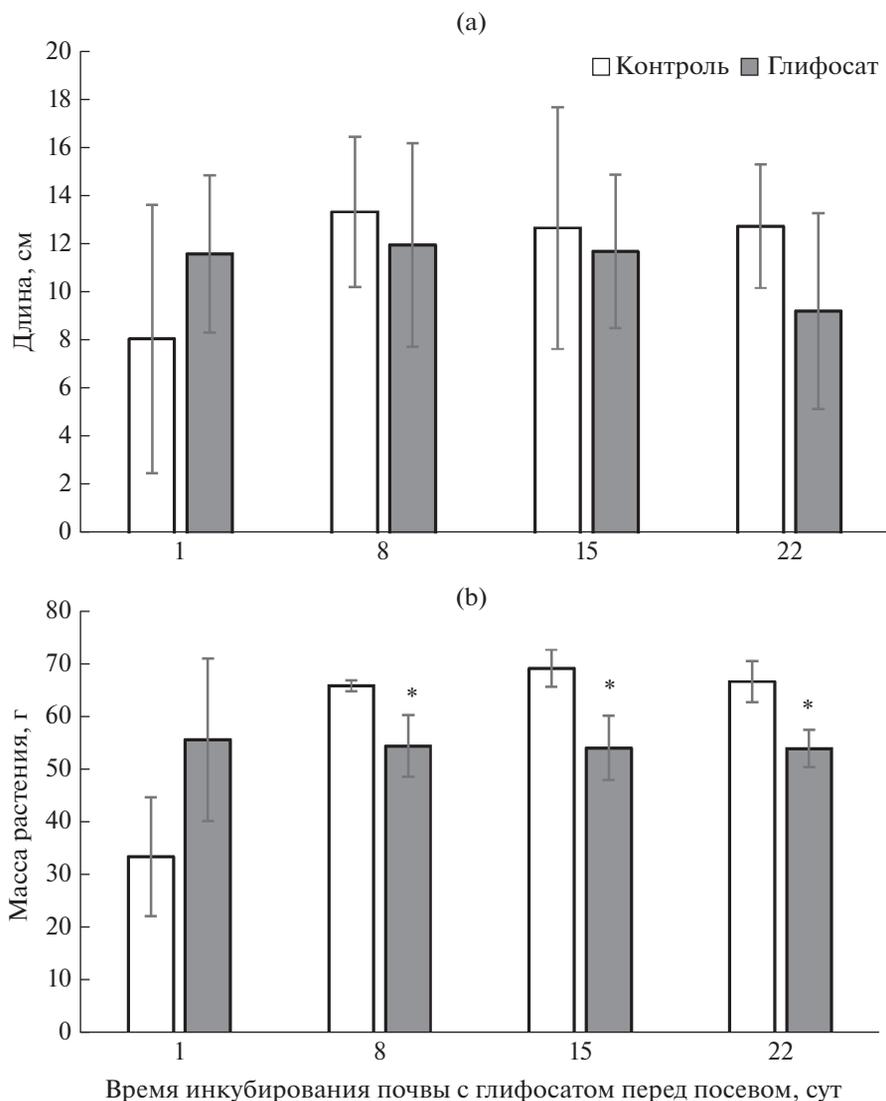


Рис. 2. Влияние глифосата на длину (а) и сухую биомассу (б) растений пшеницы при росте на дерново-подзолистой почве в условиях модельного лабораторного эксперимента. * – значимое отличие от контроля ($p = 0.05$).

на рост сельскохозяйственных культур. Причина этого последствия не всегда очевидна. С одной стороны, существуют данные о высвобождении глифосата из комплексов с почвенными минералами вследствие вытеснения фосфатами, поступающими в почву в виде фосфорных удобрений. С другой стороны, высказываются предположения о возможной фитотоксичности АМФК – первого и наиболее распространенного метаболита глифосата при его биодеградации с разрывом С–N-связи. Впервые показано, что при внесении глифосата в почву с низкой обеспеченностью доступным фосфором и деградации гербицида по саркозиновому пути с разрывом С–P-связи, исключая образование токсичных метаболитов, наблюдается выраженное отрицательное дей-

ствие глифосата на почвенные микроорганизмы через 21 сут после внесения гербицида. Это происходит вследствие снижения функционального биоразнообразия почвенного микробного сообщества, и выражается как в увеличении значения коэффициента рангового распределения d , так и в уменьшении удельной метаболической работы W микробного сообщества и интегрального индекса витальности G . Снижение биологической активности почвы привело к угнетению роста пшеницы на почве с внесенным глифосатом, что указывает на ухудшение микробиологических свойств почвы как на одну из возможных причин последствия гербицида. Оценка влияния глифосата на отдельные процессы биологического превращения азота показала, что в первые 21 сут

после внесения гербицида может наблюдаться ингибирование процесса нитрификации (на 20–40%) и стимуляция азотфиксации (на 30–80%) и денитрификации (на 300%). Однако наблюдаемые эффекты носят кратковременный характер и не отражают всего комплекса основных эффектов: на ключевой интегральный показатель биологической активности — эмиссию углекислого газа — влияния глифосата обнаружено не было. В выбранных условиях в конце эксперимента наблюдали рост численности бактерий на 40% и снижение — микромицетов на 70%. Полученные результаты показали необходимость проведения исследований, включающих, наряду с изучением отдельных процессов, протекающих при участии микроорганизмов, комплексную оценку разнообразия микробного сообщества почвы, а также определения основного пути деградации глифосата в конкретных условиях и агрохимических характеристик почвы, отражающих уровень обеспеченности питательными веществами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. 488 с.
2. Горленко М.В., Якименко О.С., Голиченков М.В., Костина Н.В. Функциональное биоразнообразие почвенных микробных сообществ при внесении органических субстратов различной природы // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17, почвоведение. 2012. № 2. С. 20–27.
3. Железова А.Д., Манучарова Н.А., Горленко М.В. Структурные и функциональные характеристики прокариотного комплекса дерново-подзолистой почвы под воздействием гербицида глифосата // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17, почвоведение. 2018. № 2. С. 48–54.
4. Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест-субстратов микробными сообществами почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом: ФР.1.37.2010.08619; ПНД ФТ 16.1.17–10. М., 2010.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 303 с.
6. Свиридов А.В., Шушкова Т.В., Ермакова И.Т., Иванова Е.В., Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А. Микробная деградация гербицида глифосата (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. № 2. С. 183–190. <https://doi.org/10.7868/S0555109915020221>
7. Степанов А.Л., Лысак Л.В. Методы газовой хроматографии в почвенной микробиологии. М.: МАКС Пресс, 2002. 88 с.
8. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС, 2007. 138 с.
9. Филиппова О.И., Куликова Н.А., Бычкова Я.С., Волков А.Б., Перминова И.В. Замедленное высвобождение азота из гуминовых веществ, модифицированных аминоорганоцианами // Проблемы агрохимии и экологии. 2015. № 1. С. 42–47.
10. Южанинова Л.А. Глифосат: применение на российском и глобальном рынках // Agroxxi.ru: агропромышленный портал. М., 1995–2022. <https://www.agroxxi.ru/gazeta-zaschita-rastenii/zrast/glifosat-primenenie-na-rossiiskom-i-globalnom-rynkah.html> (дата обращения: 27.07.2022).
11. Adero V.O., Raju N.S., Supreeth M. Effect of glyphosate herbicide on nitrogen fixing bacteria — *Azotobacter* species // J. Environ. Chem. Toxicol. 2020. V. 4. № 2. P. 1–7.
12. Aristilde L., Reed M.L., Wilkes R.A., Youngster T., Kukurugya M.A., Katz V., Sasaki C.R.S. Glyphosate-induced specific and widespread perturbations in the metabolome of soil *Pseudomonas* species // Frontiers Environ. Sci. 2017. V. 5. 34. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00034>
13. Atherton F.R., Hall M.J., Hassall C.H., Lambert R.W., Lloyd W.J., Ringrose P.S., Westmacott D. Antibacterial activity and mechanism of action of phosphonopeptides based on aminomethylphosphonic acid // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1982. V. 22. P. 571–578.
14. Borggaard O.K., Gimsing L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review // Pest Management Sci. 2008. V. 64. P. 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
15. Bott S., Tesfamariam T., Kania A., Eman B., Aslan N., Römheld V., Neumann G. Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilization // Plant and Soil. 2011. V. 342. P. 249–263. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0689-3>
16. Carlisle S.M., Trevors J.T. Effect of the herbicide glyphosate on nitrification, denitrification, and acetylene reduction in soil // Water, Air Soil Poll. 1986. V. 29. P. 189–203. <https://doi.org/10.1007/BF00208408>
17. Chen M.X., Cao Z.Y., Jiang Y., Zhu Z.W. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry // J. Chromatography A. 2013. V. 1272. P. 90–99.
18. Cherni A.E., Trabelsi D., Chebil S., Barhoumi F., Rodriguez-Llorente I.D., Zribi K. Effect of glyphosate on enzymatic activities, *Rhizobiaceae* and total bacterial communities in an agricultural Tunisian soil // Water, Air Soil Poll. 2015. V. 226. 145. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2263-8>

19. *Dick R.E., Quinn J.P.* Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation // *Appl. Microbiol Biotechnol.* 1995. V. 43. P. 545–550.
<https://doi.org/10.1007/BF00218464>
20. *Druart C., Delhomme O., de Vaufleury A., Nicho E., Millet M.* Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil // *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2011. V. 399. P. 1725–1732.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4468-z>
21. *Fuchs B., Laihonon M., Muola A., Saikkonen K., Dobrev P.I., Vankova R., Helander M.A.* Glyphosate-based herbicide in soil differentially affects hormonal homeostasis and performance of non-target crop plants // *Frontiers Plant Sci.* 2022. V. 12. P. 787958.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787958>
22. *Gomes M.P., Smedbol E., Chalifour A., Hénault-Ethier L., Labrecque M., Lepage L., Lucotte M., Juneau Ph.* Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview // *J. Experimental Botany.* 2014. V. 65. P. 4691–4703.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru269>
23. *Helander M., Pauna A., Saikkonen K., Saloniemi I.* Glyphosate residues in soil affect crop plant germination and growth // *Sci. Report.* 2019. V. 9. P. 19653.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56195-3>
24. *Helander M., Saloniemi I., Saikkonen K.* Glyphosate in northern ecosystems // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. P. 569–574.
25. ISO 10694:1995 Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis).
26. *Jenkins M.B., Locke M.A., Reddy K.N., McChesney D.S., Steinriede R.W.* Impact of glyphosate-resistant corn, glyphosate applications and tillage on soil nutrient ratios, exoenzyme activities and nutrient acquisition ratios // *Pest Management Sci.* 2017. V. 73. P. 78–86.
27. *Kulikova N.A., Philippova O.I., Bychkova Y.S., Volikov A.B., Perminova I.V.* Nitrogen release from natural and aminoorganosilane-modified humic substances // *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment.* Dordrecht: Springer, 2013.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5634-2_84
28. *Kyaw K.M., Toyota K.* Suppression of nitrous oxide production by the herbicides glyphosate and propanil in soils supplied with organic matter // *Soil Sci. Plant Nutrition.* 2007. V. 53. P. 441–447.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00151.x>
29. *Lancaster S.H., Hollister E.B., Senseman S.A., Gentry T.J.* Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate // *Pest Management Sci.* 2010. V. 66. P. 59–64.
<https://doi.org/10.1002/ps.1831>
30. *Leino L., Tall T., Helander M., Saloniemi I., Saikkonen K., Ruuskanen S., Puigbò P.* Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide // *J. Hazardous Materials.* 2020. 124556.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>
31. *Milosevic N., Govedarica M.* Effect of herbicides on microbiological properties of soil // *Matica Srpska J. Natural Sci.* 2002. V. 102. P. 5–21.
32. *Munira S., Farenhorst A., Flaten D., Grant C.* Phosphate fertilizer impacts on glyphosate sorption by soil // *Chemosphere.* 2016. V. 153. P. 471–477.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.028>
33. *Nardi S., Pizzeghello D., Gessa C., Ferrarese L., Trainotti L., Casadoro G.* A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings // *Soil Biol. Biochem.* 2000. V. 32. P. 415–419.
34. *Newman M.M., Hoilett N., Lorenz N., Dick R.P., Liles M.R., Ramsier C., Klopper J.W.* Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 543. P. 155–160.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.008>
35. *Nguyen D.B., Rose M.T., Rose T.J., Morris S.G., van Zwieten L.* Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: a meta-analysis // *Soil Biol. Biochem.* 2016. V. 92. P. 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.014>
36. *Nivelle E., Verzeaux J., Chabot A., Roger D., Chesnais Q., Ameline A., Catterou M.* Effects of glyphosate application and nitrogen fertilization on the soil and the consequences on aboveground and belowground interactions // *Geoderma.* 2018. V. 311. P. 45–57.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.0>
37. *Nivelle E., Verzeaux J., Chabot A., Roger D., Spicher F., Lacoux J., Nava-Saucedo J.E., Catterou M., Téu T.* Does nitrogen fertilization history affects short-term microbial responses and chemical properties of soils submitted to different glyphosate concentrations // *J. PLoS One.* 2017. V. 12. e0178342.
38. *Okada E., Costa J.L., Bedmar F.* Glyphosate dissipation in different soils under no-till and conventional tillage // *Pedosphere.* 2019. V. 29. P. 773–783.
39. *Silva V., Montanarella L., Jones A., Fernández-Ugalde O., Mol H.G.J., Ritsema C.J., Geissen V.* Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 621. P. 1352–1359.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>
40. *Stratton G.W., Stewart K.E.* Effects of the herbicide glyphosate on nitrogen cycling in an acid forest soil // *Water Air Soil Pollution.* 1991. V. 60. P. 231–247.
<https://doi.org/10.1007/BF00282625>
41. *Tenuta M., Beauchamp E.G.* Denitrification following herbicide application to a grass sward // *Can. J. Soil Sci.* 1996. V. 76. P. 15–22.
42. *Van Bruggen A.H.C., He M.M., Shin K., Mai V., Jeong K.C., Finckh M.R., Morris J.G., Jr.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 616–617. P. 255–268.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
43. *Zablotowicz R.M., Reddy K.N.* Impact of glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a mini review // *J. Environ. Quality.* 2004. V. 33. P. 825–831.
44. *Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S.* Recent advances in glyphosate biodegradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 5033–5043.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>
45. *Zhang M., Wang W., Tang L., Heenan M., Xu Z.* Effects of nitrification inhibitor and herbicides on nitrification, nitrite and nitrate consumptions and nitrous oxide emission in an Australian sugarcane soil // *Biol. Fertil. Soils.* 2018. V. 54. P. 697–706.
<https://doi.org/10.1007/s00374-018-1293-6>

Glyphosate Effects on Some Characteristics of Biological Activity and Phytotoxicity of Sod-Podzolic Soil in a Short-Term Model Experiment

N. V. Kostina^{1, *}, M. V. Gorlenko¹, K. A. Mazurov¹, O. I. Filippova¹, I. V. Plyushchenko¹,
I. A. Rodin¹, and N. A. Kulikova^{1, 2}

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: nvkostina@mail.ru*

In a model laboratory experiment on infertile arable soil with low biological activity, it was found that the introduction of glyphosate leads to a short-term change in the intensity of the main processes of microbial transformation of nitrogen in the soil. When incubating soil with glyphosate at the maximum recommended dose of 8 l/ha for 22 days, there is an increase in nitrogen-fixing and denitrifying activity by 30–80% and 300% and a decrease in the nitrification process by 20–40%. The effects are of a short-term nature and do not reflect the entire complex of ongoing microbiological processes: no effect of glyphosate was detected on the emission of CO₂, which is an integral indicator of biological activity. At the end of incubation in the soil with the introduced glyphosate, there was an increase in the number of bacteria by 40% and a decrease in the number of micromycetes by 70%. In general, under the selected conditions, the introduction of glyphosate led to a marked deterioration in the biological activity of the soil. By the method of multi-substrate testing, it was shown that under the action of the herbicide there is an increase in the value of the coefficient of rank diversity of the consumption spectra of substrates d , accompanied by a decrease in the specific metabolic work W and the integral vitality index G . It was shown for the first time that when glyphosate is introduced into soil with low biological activity and availability of phosphorus and the herbicide is degraded along the sarcosine pathway with a break in the C–P bond, excluding the formation of toxic metabolites, there is a pronounced negative effect of glyphosate on soil microorganisms, which leads to inhibition of wheat plant growth.

Keywords: Roundup, soil biological activity, toxicity, bioassay

ИЗМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА ПОЧВЫ
ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ СОЛОМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ
ДОСТУПНОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА

© 2023 г. О. В. Орлова^{a, *}, А. А. Кичко^a, Е. Л. Чирак^b, А. О. Зверев^a,
Т. О. Лисина^a, Е. Е. Андронов^{a, c}

^aВсероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
ш. Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608 Россия

^bАТГ Сервис Ген, пр-т Малый В.О., 57, Санкт-Петербург, 199178 Россия

^cПочвенный институт им. В.В. Докучаева, Пыжевский пер., 7, Москва, 119017 Россия

*e-mail: falenki@hotmail.com

Поступила в редакцию 30.08.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 27.12.2022 г.

Рассмотрено влияние содержания почвенного доступного органического вещества на состав и функционирование микробного сообщества при трансформации соломы ячменя в почву. Дерново-подзолистую почву (Umbric Albic Retisols (Abruptic)), слой 0–20 см, инкубировали (25°C, 60% ППВ) 4 мес. и получили модельную почву с пониженным содержанием доступного органического вещества. Провели лабораторный эксперимент с внесением соломы ячменя в нативную и модельную почву. В динамике (0, 7, 40 и 70 сут) анализировали дыхание почв, микробную биомассу, численность микроорганизмов и таксономический состав микробного сообщества (секвенирование по 16S рРНК). Качество органического вещества почвы оценивали по содержанию общего органического углерода ($C_{\text{общ}}$) и его фракций: доступного ($C_{\text{дост}}$), водорастворимого ($C_{\text{вод}}$), лабильного. Показано, что в модельной почве вдвое снижается количество $C_{\text{вод}}$ и $C_{\text{дост}}$ при отсутствии достоверных различий по содержанию $C_{\text{общ}}$. Кроме того, отмечено видимое ухудшение агрегатной структуры почвы и ускорение в ней трансформации соломы, на 25% больше, чем в нативной. На таксономический состав бактериального сообщества почвы влияли количество в почве исходного доступного органического вещества, внесение соломы и время инкубации. Уменьшение содержания доступного органического вещества изменяло состав микробного сообщества: уменьшались доли филумов Acidobacteria и Firmicutes, возрастали доли Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes и архей. Выявлено, что доминирующая часть (50% от суммы) микробного сообщества обедненной почвы характеризуется большим разнообразием и олиготрофностью. Предлагаются индикаторы для сравнения почв по олиготрофности микробного сообщества на основе таксономического состава.

Ключевые слова: дерново-подзолистая почва, Umbric Albic Retisols (Abruptic), сукцессия микробного сообщества, олиготрофная почва, 16S рРНК, дыхание почвы

DOI: 10.31857/S0032180X22601074, **EDN:** IEESPH

ВВЕДЕНИЕ

Органическое вещество (ОВ) – важнейшая составляющая почв, определяющая их плодородие и глобальные биохимические процессы, включая изменение климата. Ключевым фактором в этих процессах является микробная трансформация ОВ, в связи с чем важной характеристикой почвенного ОВ будет его доступность для микроорганизмов. В зависимости от доступности (или времени оборачиваемости) ОВ почвы подразделяют на активный и пассивный пулы [14, 15, 29, 32, 35]. Доступное ОВ является основным источником энергии и питательным субстратом, а также влия-

ет на водно-физические свойства и агрегатное состояние почв [3, 6, 8–10, 14, 15, 19, 21, 29, 30, 32].

Известно, что понятия подвижное (лабильное) и доступное (активное) ОВ почвы не идентичны [8, 9, 14, 19]. Количество в почве доступного ОВ, время оборачиваемости которого от <3 до 10 лет, определяется с использованием биокинетических методов на основе минерализации ОВ микроорганизмами [11, 14, 19, 35]. Подвижное ОВ определяется прочностью связи с минеральной частью почвы, для его выделения используют различные экстрагенты [3, 8–10, 14, 23, 35]. В таких экстрактах из-за отсутствия селективности присутствуют органические вещества различного со-

става, питательного и энергетического статуса [5, 8, 9, 15]. Следовательно, не все подвижное ОВ является активным, однако подвижную фракцию допустимо считать потенциальным резервом минерализуемого ОВ.

В современных условиях (обезлесивание, опустынивание, водная и ветровая эрозия, недостаток органических удобрений и др.) отмечается значительное сокращение содержания ОВ в пахотных почвах России [14, 20]. Прежде всего, почва теряет доступное ОВ, что приводит к увеличению олиготрофности ее микробного сообщества (МС). Известна экологическая классификация микроорганизмов (г- и к-стратегии) на основе способности утилизировать органический углерод почвы [28]. Микроорганизмы, обладающие высокими темпами роста и имеющие численное преимущество в средах, обогащенных доступным ОВ, относятся к г-стратегам (копиотрофам). К-стратегии (олиготрофы) – медленно растущие микроорганизмы, с мощным ферментативным аппаратом, более эффективно разлагающие ОВ меньшей доступности и пониженной концентрации в среде [28, 33, 39, 42]. Для почв, различающихся по землепользованию, влияющему на накопление ОВ, метагеномными исследованиями показан значительный контраст по представленности популяций копиотрофов и олиготрофов, например, выявлен рост доли олиготрофов при снижении содержания ОВ [33, 39, 42]. Олиготрофное МС характеризуется преобладанием *Alpha*- и *Deltaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* и *Acidobacteria* [26, 33, 37, 38, 41, 42]. Существует мнение, что почвы с преобладанием олиготрофов могут иметь низкий оборот углерода [39].

Наиболее эффективно различия почв по качественному составу МС проявляются при определенных внешних воздействиях [4]. В качестве внешнего фактора рекомендуют использовать внесение свежего ОВ (метод иницированного МС) [4]. В настоящем эксперименте иницирующим фактором служила солома. Возможны два сценария разложения соломы в почве с олиготрофным МС: ускоренное разложение со значительными потерями CO₂ из почвы и, напротив, замедленное с повышенным закреплением углерода (рост секвестрации).

Изучение влияния количества почвенного доступного ОВ на функционирование МС осложнено трудностью в подборе почв, различающихся только по данному признаку. В связи с этим разработан способ получения таких модельных почв искусственно.

Цель работы – оценка влияния уменьшения количества доступного ОВ в почве на состав и функционирование МС.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили с дерново-подзолистой почвой (Umbric Albic Retisols (Abruptic)) под залежью, отобранной из слоя 0–20 см в ОПХ “Родина” (Псковская область). Для получения модельной почвы с пониженным содержанием доступного ОВ проводили четырехмесячную предварительную инкубацию (при 25°C, 60% полной полевой влагоемкости (ППВ) и перемешивании раз в неделю). Оба варианта почвы: исходную, нативную (далее П1) и обедненную за 4 мес. предварительной инкубации доступным ОВ (далее П2) использовали для дальнейшего эксперимента (табл. 1). Варианты: П1 контроль, П1 + солома; П2 контроль, П2 + солома. Опыт проводили в чашках Петри (повторность 17-кратная на вариант) и 500 мл флаконах для учета выделения CO₂ (5-кратная повторность). Навеска сухой почвы 50 г на чашку и 30 г на флакон. В соответствующие варианты в почву вносили 1% измельченной до 2–3 мм соломы ячменя (зольность 7.6%, N_{общ} 1.95%, P_{общ} 1.1%, K_{общ} 2.47%). Почву в чашках и флаконах увлажняли до 50% ППВ с учетом воды, необходимой для увлажнения соломы. Инкубацию проводили под стеклянными колпаками для сохранения влажности на постоянном уровне (контроль по весу 1 раз в 10 сут) при 23–25°C. В динамике (0, 7, 40 и 70 сут) оценивали выделение CO₂, содержание нитратов, аммонийного азота, водорастворимого углерода, микробной биомассы и таксономическую структуру микробиома (на основании высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S-rРНК). Анализы проводили из смешанного образца в 3–5-кратной повторности.

Химическую характеристику почвы и соломы выполняли общепринятыми методами [1, 17]. Общий углерод (C_{общ}) почвы определяли по Тюрину, сжигание в сушильном шкафу, окончание титриметрическое. Количество остаточной соломы в почве оценивали методом флотации в 0.5 н. Na₂SO₄ [13]. Водорастворимые соединения (C_{вод}) выделяли горячей водной вытяжкой [23]. Подвижные гумусовые соединения (C_{лаб}, лабильный гумус в терминологии конца XX в.) из почв выделяли 0.1 н. пиррофосфатом Na (рН 10.0). Содержание органического углерода в вытяжках исследовали по Паникову с соавт. [12] на спектрофотометре Ultraspec (ЛКВ, Швеция; λ = 340 нм). Эмиссию CO₂ из почв определяли газохроматографическим методом на хроматографе Цвет (ОКБА НПО “Химавтоматика”, Россия), газ носитель – гелий, детектор – катарометр. Биомассу микроорганизмов оценивали методом субстрат индуцированного дыхания [40]. Количество доступного ОВ определяли инкубационным методом [11]. Численность физиологических групп микроорганизмов – стандартными методами [18].

Таблица 1. Химические показатели дерново-подзолистой почвы (П1 – нативная; П2 – обедненная доступным ОВ)

Показатель	П1			П2		
	до инкубации	через 70 сут		до инкубации	через 70 сут	
		без соломы	+ солома		без соломы	+ солома
$C_{\text{общ}}, \%$	1.20 ± 0.04	1.11 ± 0.05	1.22 ± 0.05	1.18 ± 0.02	1.09 ± 0.03	1.25 ± 0.03
$C_{\text{вод}}, \text{мг}/100 \text{ г}$	41.2 ± 1.6	28.4 ± 2.7	31.3 ± 0.4	19.4 ± 0.9	16.6 ± 1.9	29.4 ± 1.0
$C_{\text{лаб}}, \text{мг}/100 \text{ г}$	160 ± 17.8	120 ± 16.2	142 ± 7.5	136 ± 7.7	115 ± 7.2	128 ± 10.4
Потери с дыханием, мг $C-CO_2/100 \text{ г}$	–	143.5 ± 5.0	571.6 ± 11.9 (428.1)*	–	70.3 ± 2.7	474.9 ± 18.4 (404.6)*
$N_{\text{общ}}, \%$	0.230 ± 0.03	0.214 ± 0.01	0.220 ± 0.03	0.239 ± 0.07	0.219 ± 0.03	0.216 ± 0.04
$pH_{\text{КСл}}$	5.22 ± 0.01	5.32 ± 0.02	5.17 ± 0.02	5.56 ± 0.02	4.82 ± 0.05	5.23 ± 0.03
$P_{\text{подв}}, \text{мг } P_2O_5/100 \text{ г}$	1.47 ± 0.17	2.01 ± 0.37	2.07 ± 0.26	1.57 ± 0.13	1.60 ± 0.20	1.77 ± 0.13
$K_{\text{подв}}, \text{мг } K/100 \text{ г}$	1.98 ± 0.06	2.53 ± 0.54	5.65 ± 0.21	2.88 ± 0.04	2.46 ± 0.96	6.83 ± 1.3
Нитраты, мг N/ 100 г	0.11 ± 0.0	6.22 ± 0.65	1.32 ± 0.49	7.7 ± 0.52	10.0 ± 0.71	2.35 ± 0.00

* Потери за вычетом контроля; для $C_{\text{общ}}$ и $C-CO_2$ объем выборки 5, для остальных величин – 3 повторности, \pm стандартное отклонение.

Таксономический состав бактериального сообщества почв определяли с применением высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК. Для этого выделяли ДНК с использованием наборов MoBio (США) из навески 0.2 г замороженной почвы с добавлением приблизительно равного по объему количества матрикса (шариков) [2]. Для получения библиотеки гена 16S-рРНК бактерий использовали пару праймеров fBD1/rBD1: 642f 5'-НААТНУГТGC-CAGCAGC-3', 1445r 5'-GTCRTCCYDCCTCCTC-3' с соответствующими баркодами и служебными последовательностями. Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, США) в следующем режиме: начальная денатурация при 95°C – 3 мин, 32 цикла, 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин, завершающий синтез – 72°C 5 мин [7]. Библиотеки секвенировали с использованием секвенатора Junior GS (Roche, США) в соответствии с руководством к прибору.

Результаты секвенирования обрабатывали в программе QIIME [25] согласно рекомендациям авторов, по следующему алгоритму: демуплексинг библиотек и фильтрация по качеству прочтения; *de novo* ОТЕ-пикинг и аннотация референсных последовательностей при помощи встроенного классификатора GreenGenes [27]; удаление синглетонов; удаление химер проводили с помощью алгоритма uchime в программе vsearch [36]; анализ представленности таксонов; анализ бета-разнообразия; нормализация прочтений и анализ альфа-разнообразия. Статисти-

ческую обработку остальных данных осуществляли с использованием программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходно П2 по сравнению с нативной П1 содержала меньше подвижных (в водной и пирофосфатной вытяжках) и доступных (соответственно 6 и 12% от $C_{\text{общ}}$) ОВ, при этом различия по содержанию общего углерода статистически недостоверны. Снижение количества доступного ОВ в П2 по сравнению с П1 было больше для легкоминерализуемого (соответственно 383 и 922 мг С/кг), чем для среднедоступного (320 и 513 мг С/кг для П2 и П1) углерода (разделение на фракции по Орловой [11]). За счет интенсивной минерализации в процессе получения П2 в ней было больше содержание минеральных соединений азота, подвижных калия и фосфора.

Отмечено, что при одинаковой влажности (17.62 ± 0.32 и $17.78 \pm 0.12\%$ соответственно П1 и П2, среднее из трех повторностей и стандартное отклонение) обедненная доступным ОВ почва потеряла агрегатную структуру и выглядела пересушенной (рис. 1), подтверждая мнение о том, что лабильное ОВ является “клеем” почвенных агрегатов [8–10, 15, 21, 22]. Существенных различий по влагоемкости почв (соответственно 37.92 ± 0.35 и $38.72 \pm 1.2\%$) не выявлено.

Условия лабораторного эксперимента способствовали минерализации ОВ, что привело к сокращению, как общего, так и подвижного углерода в контрольных вариантах к концу опыта. Для обедненной доступным ОВ почвы снижение со-

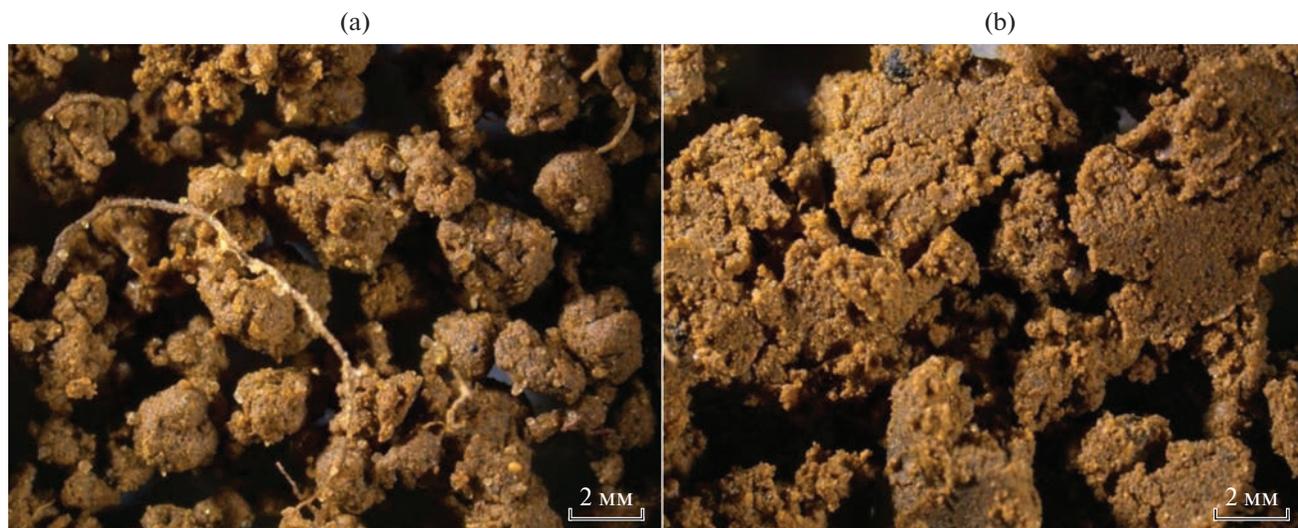


Рис. 1. Агрегатная структура почв: П1 (а) и П2 (б).

держания подвижных соединений было меньше: соответственно для П1 и П2 убыль $S_{\text{лаб}}$ составляла 25.0 и 15.9%, $S_{\text{вод}}$ – 31.1 и 14.4%. Внесение соломы приводило к сохранению, и даже некоторому увеличению, содержания $S_{\text{общ}}$ и $S_{\text{вод}}$ в почве, за исключением $S_{\text{лаб}}$ для П1. Потери CO_2 за счет соломы из почвы П1 и П2 были практически одинаковы.

За счет минерализации соломы произошло увеличение содержания подвижных фосфора (прибавка на 3 и 10% для П1 и П2 соответственно) и калия (прибавка 123 и 178%) в почве относительно контрольных вариантов. Содержание нитратного азота в вариантах с соломой снижалось на 79% для П1 и на 76.5% для П2.

Функционирование микробного сообщества почв оценивали по разложению соломы, дыханию и величине микробной биомассы. Наблюдали увеличение скорости минерализации соломы в почве, обедненной доступным ОВ: соответственно в П2 и П1 разложилось к концу опыта 67.1 и 41.7% от внесенной соломы. Выделение CO_2 из П1 было больше по сравнению с П2 (рис. 2) на всем протяжении эксперимента, в том числе для вариантов с внесением соломы. Активное разложение соломы наблюдали до 40–45 сут, далее разница по эмиссии CO_2 практически нивелируется для вариантов с соломой и без. Содержание микробной биомассы отражает количество доступного углерода в почве [14, 35, 30]. Биомасса микроорганизмов при внесении соломы существенно увеличивается на 7 и 40 сут как в П1, так и в П2, к 70 сут различия становятся незначительными. За редким исключением в П2 содержание микробной биомассы меньше, чем в соответствующих вариантах П1.

Отмечено, что в П2 ниже не только дыхание и биомасса микроорганизмов, но и их численность: средние за опыт значения в П1 и П2 соответственно: аммонифицирующих 13.0 ± 0.3 и 5.4 ± 0.1 млн КОЕ/г, амилитических – 13.2 ± 1.0 и 4.4 ± 0.8 млн КОЕ/г. Показано, что в П2 в 2.6 раза больше целлюлозолитических микроорганизмов (среда Гетчинсона) – 16.7 против 6.5 тыс. КОЕ/г в П1. Внесение соломы ожидаемо увеличило численность почвенных микроорганизмов: в 1.7–2 раза аммонифицирующих и амилитических, и в 5.6 и 6.2 раза целлюлозолитических. Однако для варианта П2 + солома в течение всего опыта численность аммонифицирующих и амилитических микроорганизмов была меньше, чем для П1 в 2.1 и 3.6 раза, а целлюлолитических, напротив, выше в 2.8 раза. Следовательно, по численности физиологических групп микроорганизмов в П2 наблюдали сдвиг состава МС в сторону большей олиготрофности.

В результате секвенирования получено 136332 прочтений, 107445 из которых прошли фильтры качества. Всего в анализе использовали данные 48 образцов, со средней глубиной секвенирования 4703 прочтения на образец, средняя длина прочтений составила 309 п.н. Для анализа альфа-разнообразия проводили нормирование количества последовательностей до 1471 последовательности на образец.

Филогенетический анализ по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК выявил в вариантах в разные сроки от 400 до 615 операционных таксономических единиц. Внесение соломы в оба варианта почвы во все сроки анализа снизило количество операционных таксономических единиц. Показано, что в начале эксперимента в нативной почве П1

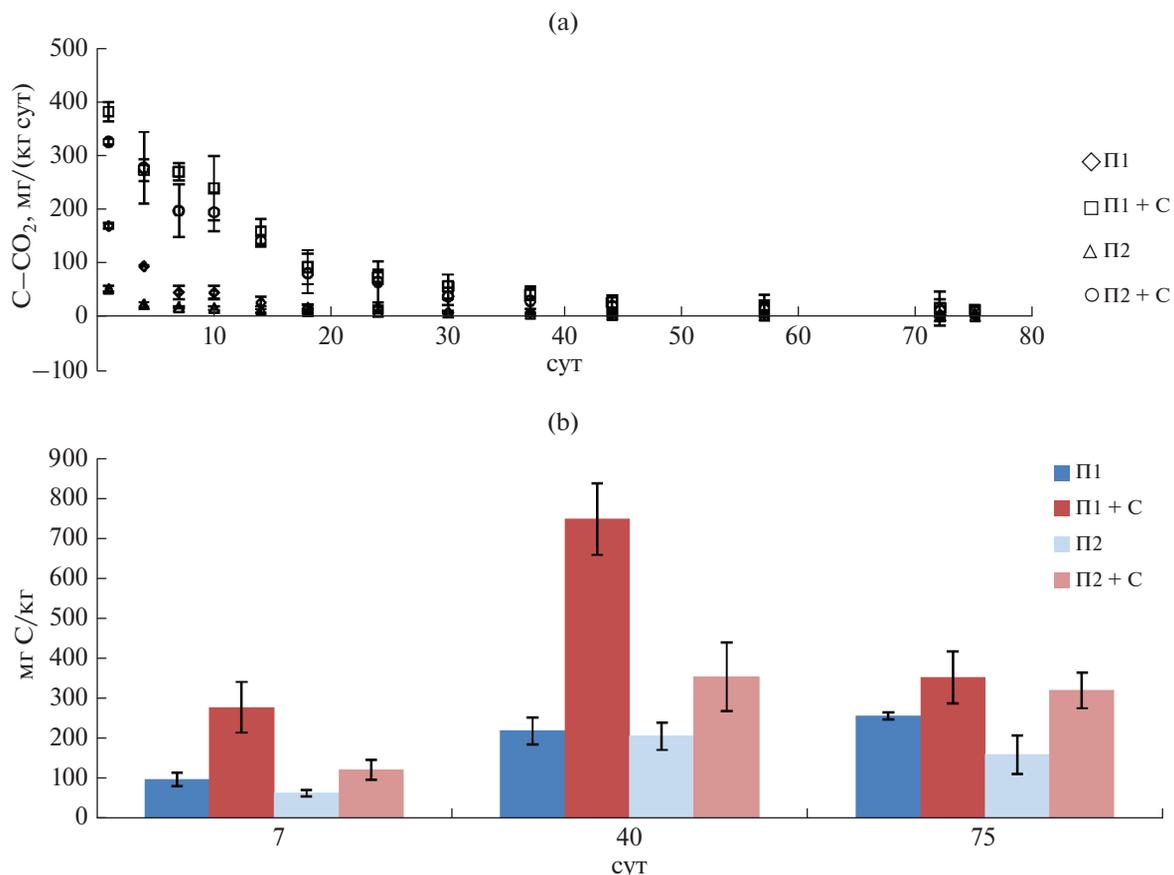


Рис. 2. Динамика дыхания почв (а) и содержания микробной биомассы (б). Варианты здесь и далее: П1 – почва 1; П1 + С – почва 1 с внесением соломы; П2 – почва 2; П2 + С – почва 2 с внесением соломы.

выше количество видов (Chao1) и разнообразие МС (индекс Шеннона), при дальнейшей инкубации величина индексов в вариантах почвы выравнивается и меняется на противоположное – МС в

П2 становится более олиготрофным по биоразнообразию (табл. 2). Внесение соломы в П1 и П2 снижает разнообразие МС по обоим индексам, особенно на 7 сут. При сравнении МС вариантов

Таблица 2. Индексы биоразнообразия микробного сообщества почвы

Вариант	0 сут	7 сут	40 сут	70 сут
Индекс Chao1				
П1 контроль	1925 ± 111	1519 ± 40	1252 ± 38	1644 ± 303
П1 + солома	1377 ± 99	1246 ± 37	1294 ± 121	2191 ± 231
П2 контроль	1540 ± 224	1157 ± 182	1158 ± 92	1754 ± 339
П2 + солома	1300 ± 276	1173 ± 72	1305 ± 22	2219 ± 123
Индекс Шеннона				
П1 контроль	8.00 ± 0.20	7.52 ± 0.12	7.19 ± 0.05	7.87 ± 0.13
П1 + солома	7.21 ± 0.24	6.03 ± 0.14	6.68 ± 0.21	7.05 ± 0.17
П2 контроль	7.33 ± 0.37	7.32 ± 0.08	7.55 ± 0.26	7.88 ± 0.24
П2 + солома	7.14 ± 0.78	6.30 ± 0.13	6.94 ± 0.09	7.57 ± 0.10

Примечание. Объем выборки – 3 повторности, ± стандартное отклонение.

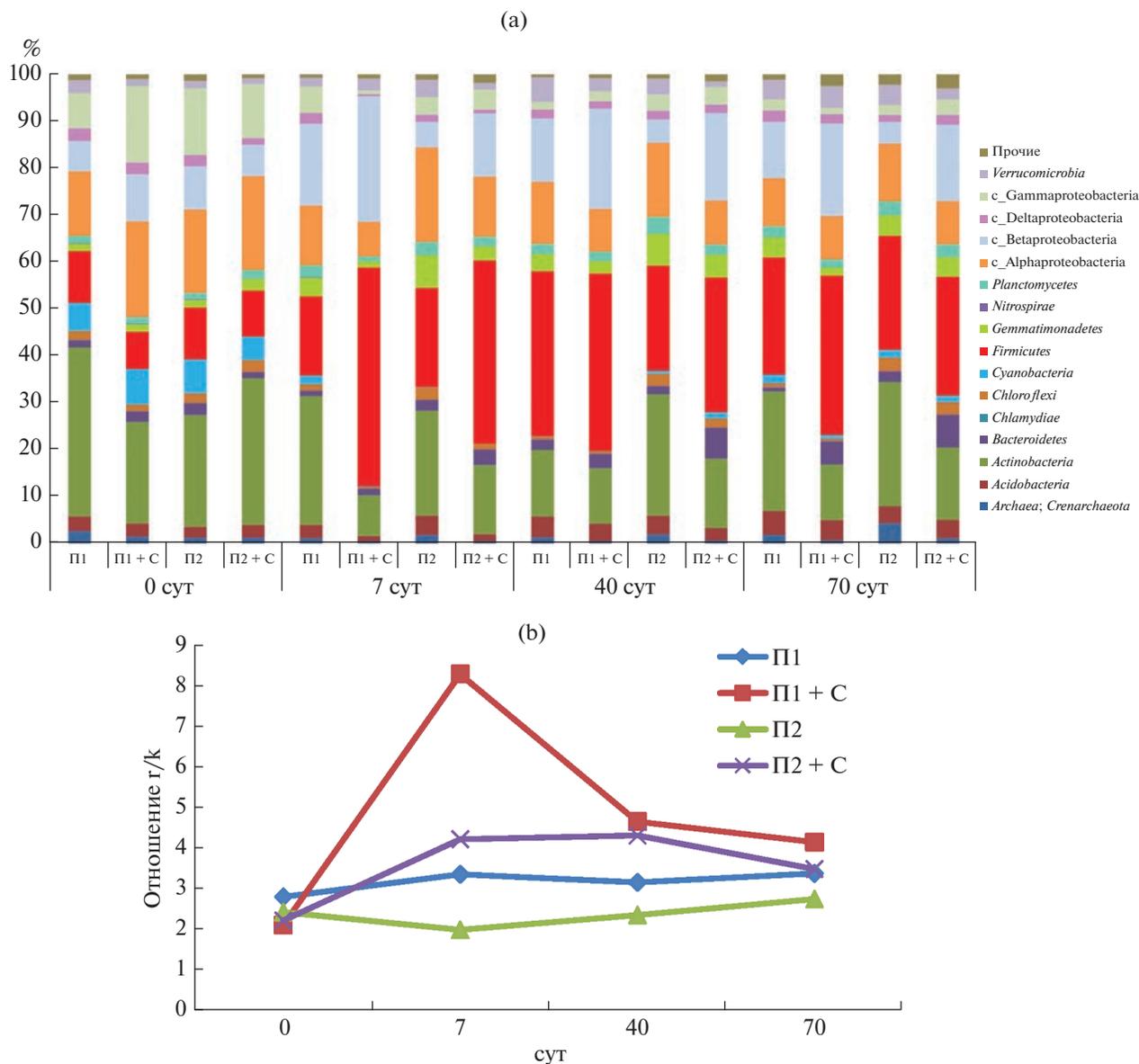


Рис. 3. Таксономический состав микробного сообщества (а) почв и отношение в нем г- и к-стратегов (б).

П1 + солома и П2 + солома прослеживается тенденция роста биоразнообразия при меньшем количестве доступного ОВ.

В бактериальном сообществе доминируют филумы *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes* (рис. 3), достигающие в сумме для П1 80–85%, а П2 – 75–80%. При сравнении таксономического состава МС контрольных вариантов выявлено, что для обедненной доступным ОВ почвы характерно уменьшение доли *Acidobacteria* и *Firmicutes* и увеличение *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* и архей, т.е. возрастает доля филогенов, относимых к олиготрофам (к-стратегам). Наиболее чувствительными к количеству доступного ОВ оказались филы *Proteo-*

bacteria и *Armatimonadetes*. Среди *Proteobacteria* в П2 увеличиваются доли *Alphaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria*, при снижении *Betaproteobacteria*. Для более мелких таксонов также можно выделить реагирующих на содержание доступного ОВ в почве. Так, исходно в П2 ниже доля представителей отряда *Solirubrobacterales* (семейства *Conexibacteraceae*, *Patulibacteraceae* и *Solirubrobacteraceae*), семейства *Koribacteraceae* (в 2.5–5 раз), родов *Geodermatophilus* (с 0.26 до 0.07%) и *Streptomyces* (с 2.42 до 0.56%). Практически на порядок уменьшается доля рода *Alicyclobacillus*, тогда как доля *Bacillus* снижается незначительно. Увеличивается доля представителей семейства *Frankiaceae* (с 0.18 до 0.33%), значительно (от 2 до 8 раз) почти всех

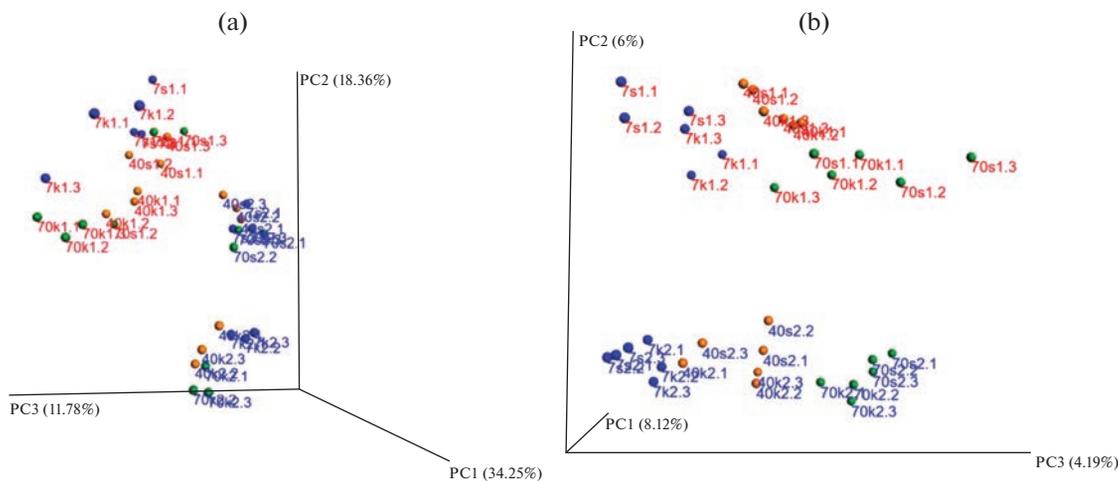


Рис. 4. Анализ данных таксономической структуры микробных сообществ методом главных компонент. Красный цвет – П1, синий – П2, а – взвешенные данные, б – невзвешенные.

представителей семейств *Intrasporangiaceae* и *Miscosaccaceae*, несколько слабее – *Pseudonocardia*ceae. Все это свидетельствует о существенном влиянии содержания доступного ОВ (почва П1 или П2) на состав бактериального сообщества.

Обеднение почвы доступным ОВ имело эффект накопительной культуры для олиготрофной части МС с получением преимуществ в нем над условными г-стратегиями (*Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Gemmatimonadetes*) к-стратегов (*Alpha-* и *Deltaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* и *Acidobacteria*) [33, 42], обычно вступающих в процесс разложения субстратов на последних стадиях. Условность разделения понятна: из-за огромного филогенетического и физиологического разнообразия внутри каждого бактериального типа маловероятно, что весь тип будет демонстрировать одинаковые экологические характеристики [39]. В эксперименте наблюдали, что в П2 во все сроки анализа соотношение г/к ниже, чем в П1. В пользу преобладания в почве П2 к-стратегов свидетельствуют и данные по меньшим потерям CO_2 из внесенной соломы, несмотря на больший объем разложившейся, так как считается, что почвы с преобладанием олиготрофов могут иметь меньшие выбросы CO_2 [39]. Следовательно, МС П2 приобрело олиготрофные черты.

Внесение соломы в оба варианта почвы приводит, с одной стороны, к сходным изменениям: снижается доля актинобактерий, особенно в первые сроки, возрастает доля *Firmicutes*, меняется на противоположное соотношение альфа- и бетапротейобактерий (первые относят к к-, вторые – к г-стратегам). С другой стороны, выявлены и различия: в П2 ниже доля бацилл, но выше представленность актинобактерий и бактериоидов, среди

последних много целлюлозоразлагающих микроорганизмов (например, представители семейства *Cytophagaceae*).

Анализ таксономического состава бактериальных сообществ методом главных компонент выявил, что основной фактор различия – это варианты почвы, т.е. в итоге содержание доступного ОВ. Даже по невзвешенным данным (качественные различия, без учета представленности фило-типов) исследуемые почвы четко разделялись, несмотря на то, что доля объясненной дисперсии по наиболее значимой оси не выше 8.1% (рис. 4б). Различия между почвами усиливаются, если учитывать количественные данные по фило-типам (взвешенные данные), доля объясненной дисперсии достигает 34.2%.

Следующими важными факторами являются внесение соломы и срок отбора образцов, т.е. время инкубации. На рис. 4 видно, что образцы П2 разделяются по взвешенным данным на две группы в зависимости от наличия или отсутствия соломы. Для нативной почвы (П1) большее значение имел фактор времени инкубации, чем внесение соломы. Следует отметить, что сукцессия МС более видна на невзвешенных данных, т.е. изменения МС в зависимости от срока отбора образцов – качественные (изменения таксономического состава).

ОБСУЖДЕНИЕ

Предложен способ получения модельной почвы для изучения влияния количества доступного ОВ в почве на различные показатели, в том числе состав и функционирование МС. Снижение количества доступного ОВ без существенных потерь $S_{\text{общ}}$ достигается предварительной инкубацией почвы при оптимальных для минерализации ОВ

условиях в течение 3–4 мес. Достоинством модели является отсутствие различий по гранулометрическому, минералогическому составу и другим показателям почв, что сложно выполнить для естественных почв с разным уровнем доступного ОВ.

Известна главенствующая роль химически подвижных и биологически активных компонентов ОВ почвы в процессах образования агрономически ценной структуры почвы [9, 15, 21, 22]. Показано, что уменьшение в почве П2 содержания подвижных и доступных фракций углерода в 2 раза, несмотря на неизменность содержания $C_{\text{общ}}$, привело к дезагрегации почвы. Исходя из того, что в П2 в наибольшей степени истощалась легкоминерализуемая фракция доступного ОВ (убыль на 60% относительно П1), можно полагать именно ее связующим материалом агрегатов. Снижение количества агрегатов размером 3–2, 2–1 и 1–0.5 мм при обеднении дерново-подзолистой почвы активным ОВ показано и другими исследователями [9].

Во фракцию $C_{\text{лаб}}$ входят различные по составу вещества, в том числе водорастворимые и легкоминерализуемые, а не только устойчивые гумусовые соединения [5, 9]. Тем не менее, в П2 содержание $C_{\text{лаб}}$ было меньше на 15%. Исходное обеднение возможных источников $C_{\text{лаб}}$ в П2 может быть причиной его меньшей относительной убыли в процессе инкубации, как в контрольных вариантах (на 15 и 25% в П2 и П1), так и при внесении соломы (соответственно на 6.0 и 15.4%).

Увеличение скорости минерализации соломы в П2 относительно П1 (соответственно к концу опыта разложилось 67 и 41.7% от внесенной соломы) связано не только с большей обеспеченностью П2 минеральным азотом, но возможен существенный вклад состава МС. Во-первых, содержание минерального азота в почве ниже оптимального для разложения соломы ячменя (в наличии 0.7% N, надо – 1.0–1.5% на вес соломы). Во-вторых, эффективность разложения труднодоступного субстрата, каким является солома ячменя, МС олиготрофной и естественной почвы будет различаться.

Наблюдаемая в контрольных вариантах сукцессия МС, по-нашему мнению, вызвана использованием для опыта сухой почвы, без предварительного увлажнения и компостирования. Известно, что при увлажнении сухой почвы происходит увеличение количества доступного ОВ [24, 30, 31].

Значительный интерес представляют индикаторные показатели, дающие возможность интерпретации микробного филогенетического состава с экологическими функциями МС и качеством ОВ. Такие индикаторы ценны, так как прямое определение потенциально минерализуемого ОВ биокинетическими методами занимает длительное время – 100–150 сут [9, 11, 14, 35]. В то же время снижение количества доступного ОВ в почве является первым шагом к деградации ОВ почвы.

Поэтому индикаторы будут полезны при оценке различных вариантов обработки почвы, систем удобрений, севооборотов и др.

В качестве индикаторов обеспеченности почвы доступным ОВ предлагается использовать соотношения филумов МС, которые стабильно (во все сроки) существенно ниже или выше в одной из почв. В табл. 3 представлен результат деления соотношения филумов в почве П1 на аналогичное в П2 отдельно для контролей и вариантов с внесением соломы. Такой показатель взят для удобства, чтобы можно было отбросить значения, близкие к 1, оставив более значимые. Выбранные в качестве индикаторов истощения доступным ОВ в почве соотношения выделены в таблице желтым. Интересно, что таких индикаторных соотношений выявлено для контролей меньше, чем для вариантов с соломой (соответственно 8 и 18), т.е. подтверждается, что различия между составом МС усиливаются при внесении свежих растительных остатков. Для контрольных почв индикаторами обедненности почв доступным ОВ служат большие соотношения *Proteobacteria/Chloroflexi*, *Firmicutes/Chloroflexi*, *Acidobacteria/Chloroflexi* и *Actinobacteria/Chloroflexi*, а также низкие значения отношений *Bacteroidetes/Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes/Proteobacteria*, *Bacteroidetes/Firmicutes* и *Acidobacteria/Proteobacteria*. Среди представителей *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes* много олиготрофных микроорганизмов [26, 28, 33, 42], с чем связано их увеличенное количество в П2 и, соответственно, возможность использовать соотношения с этими филами в качестве индикатора. Применимость данных соотношений в качестве индикаторных для других почв нуждается в проверке.

Анализ доминирующей части МС (рис. 5) провели, взяв филотипы, дающие в сумме 50% от суммы обнаруженных, и получили известные из классической микробиологии закономерности сукцессии микроорганизмов при внесении свежего органического субстрата [4]. На первом этапе наблюдали резкое увеличение численности г-стратегов, при доминировании 2–3 видов. Далее, с исчерпанием наиболее легкодоступных соединений, все большее участие начинают принимать другие виды, способные перерабатывать более стойкие соединения, в результате разнообразие МС увеличивается.

Интересно, что доминирующие филотипы в почве с разным количеством доступного ОВ совпадают не более чем на 50%. Почва П2 характеризуется более зрелым бактериальным сообществом [4], включающим большее количество доминирующих филотипов.

Внесение соломы в почвы снижает количество доминирующих филотипов относительно контроля. Однако в П2 сохраняется большее разно-

Рис. 5. Динамика доминирующих филоотипов в почвах на 40 и 70 сут опыта, П1 — исходная почва, П2 — почва, обедненная доступным ОВ; П1 + С — почва 1 с внесением соломы; П2 — почва 2; П2 + С — почва 2 с внесением соломы, где

Условное обозначение	Порядок	Семейство	Род
Bacill	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
Alic-bacil		Alicyclobacillaceae	Alicyclobacillus
Bacillal	Burkholderiales	f_***	g_***
Oxalob		Oxalobacteraceae	g_***
Burkh		Burkholderiaceae	Burkholderia
Comam		Comamonadaceae	Other
Chthon	[Chthoniobacterales]	[Chthoniobacteraceae]	DA101**
Enterob	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	g_***
Micrococ-1	Actinomycetales	Micrococcaceae	Rothia
Micrococ-2		Micrococcaceae	g_***
Streptom		Streptomycetaceae	Streptomyces
Gaiel	Gaiellales	Gaiellaceae	g_***
Ellin5301	Gemmatimonadales	Ellin5301**	g_***
Ellin5301	Gemmatimonadales	Ellin5301**	g_***
Strept	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
Nitros	Nitrososphaerales	Nitrososphaeraceae	Candidatus Nitrososphaera
Hypho	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes
Rhizob		f_***	g_***
Chitino	[Saprosirales]	Chitinophagaceae	g_***
Sphing-1	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Kaistobacter
Sphing-2		Sphingomonadaceae	Other
SC-I-84	SC-I-84**	f_***	g_***
Solir	Solirubrobacterales	f_***	g_***
Solirubr		Solirubrobacteraceae	g_***
Conexi		Conexibacteraceae	g_***
Patuli		Patulibacteraceae	g_***
Xanth	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	g_***
Other	Other*	Other*	Other*
WD2101	WD2101**	f_***	g_***

*Объединены неатрибутируемые на всех уровнях таксоны.

**Таксоны, для которых неизвестны культивируемые представители.

***Таксономия не определена (f_ — на уровне семейства, g_ — на уровне рода).

образии доминирующих микроорганизмов и при внесении соломы. Для использованной в опыте почвы отмечена очень высокая доля микроорганизмов рода *Bacillus*, она колеблется от 32.7–33.4 на 7 сут до 23.5–19.9% на 70 сут. Кроме рода *Bacillus* в разложении соломы в П1 участвуют и другие бациллы, например род *Alicyclobacillus*. Для П2 заметно участие с первых сроков протеобактерий и актинобактерий. Через 40 сут, особенно в П2, среди доминирующих микроорганизмов, разлагающих солому, появляются целлюлозоразлагающие микроорганизмы такие, как Chitinophagaceae, Chthoniobacteraceae, Micrococcaceae, Xanthomonadaceae, входящие в филумы *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*. Выделение доминирующих филоотипов, свидетельствует о более олиготроф-

ном МС в П2, что служит косвенным обоснованием ускоренного разложения соломы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен способ получения модели для изучения влияния количества доступного ОВ в почве на состав и функционирование микробных сообществ, свободной от недостатков, возникающих при использовании естественных почв, таких как различия в минералогическом и/или гранулометрическом составе, рН, истории поля и прочего.

Показано увеличение скорости минерализации соломы в П2 относительно П1: минерализовалось к концу опыта соответственно 67 и 41.7% от внесенной соломы.

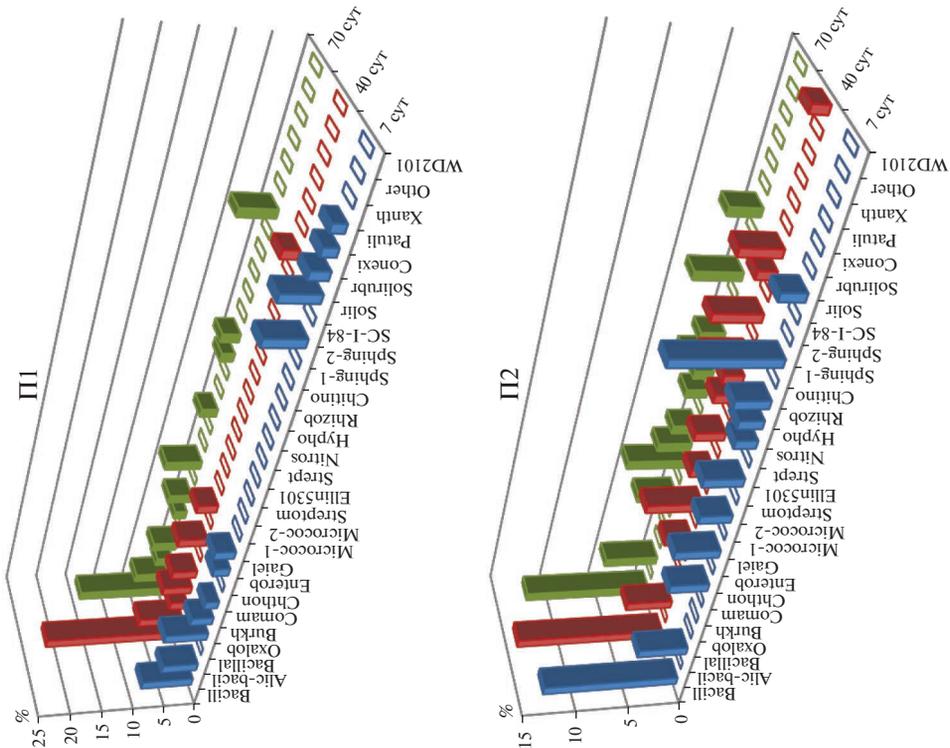
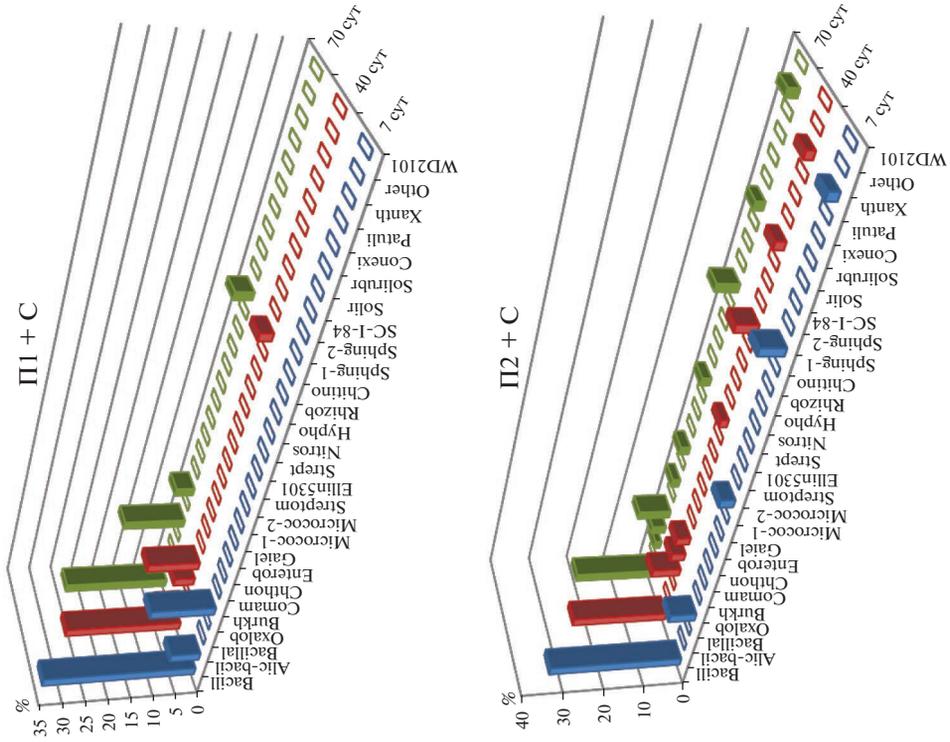


Таблица 3. Соотношения представленности фил в парных сравнениях (*Acido/Acidobacteria*, *Actin/Actinobacteria*, *Bact/Bacteroidetes*, *Chloro/Chloroflexi*, *Gemm/Gemmatimonadetes*, *Firm/Firmicutes*, *Planct/Planctomycetes*, *Proteo/Proteobacteria*, *Verruc/Verrucomicrobia*), определяемое, как $[(P_1/P_2)_{П1}:(P_1/P_2)_{П2}]$, где P_1 и P_2 – представленности фил в микробиомах П1 и П2

Соотношение	7 сут	40 сут	70 сут	Соотношение	7 сут	40 сут	70 сут
Без соломы				Солома			
Proteo/Chloro	2.31	4.67	4.62	Proteo/Chloro	5.88	3.43	5.42
Firm/Chloro	1.49	6.32	3.62	Acido/Chloro	4.10	4.86	5.64
Acido/Chloro	1.30	4.57	4.94	Actin/Chloro	3.08	2.69	3.98
Actin/Chloro	2.30	2.21	3.37	Firm/Gemm	2.91	2.36	3.21
Bact/Chloro	0.94	5.05	1.40	Bact/Chloro	2.20	1.58	3.71
Acido/Bact	1.39	0.90	3.53	Acido/Gemm	1.92	2.59	2.61
Proteo/Gemm	2.18	2.15	1.32	Acido/Bact	1.87	3.08	1.52
Firm/Gemm	1.41	2.90	1.029	Firm/Planct	2.47	1.46	2.11
Acido/Actin	0.56	2.07	2.03	Actin/Bact	1.40	1.71	1.07
Actin/Verruc	2.42	0.35	0.99	Actin/Planct	1.22	0.89	1.21
Bact/Gemm	0.88	2.33	0.40	Bact/Planct	0.87	0.52	1.13
Acido/Verruc	1.37	0.73	1.45	Actin/Proteo	0.52	0.79	0.73
Bact/Planct	0.57	2.15	0.54	Firm/Verruc	0.69	0.55	0.68
Acido/Firm	0.87	0.72	1.37	Actin/Firm	0.49	0.61	0.57
Actin/Firm	1.54	0.35	0.93	Acido/Verruc	0.46	0.61	0.55
Firm/Proteo	0.65	1.35	0.78	Bact/Proteo	0.37	0.46	0.68
Acido/Proteo	0.56	0.98	1.07	Proteo/Verruc	0.56	0.43	0.53
Bactn/Verruc	0.99	0.80	0.41	Bact/Firm	0.35	0.36	0.53
Actin/Proteo	0.99	0.47	0.73	Actin/Verruc	0.34	0.34	0.39
Bact/Firm	0.63	0.80	0.39	Bactn/Verruc	0.24	0.20	0.36
Bact/Proteo	0.40	1.08	0.30	Firm/Chloro	0.01	0.03	0.05

Примечание. Интенсивность окраски соответствует большим различиям между почвами; синий цвет (значения >1) – соотношение фил больше в нативной почве, красный (значения <1) – соотношение фил больше при обеднении почвы доступным ОВ (П2). Желтым выделены соотношения, предлагаемые в качестве индикаторов олиготрофности.

Обеднение почвы доступным органическим веществом (для П2) имело эффект накопительной культуры для олиготрофной части микробного сообщества, с получением преимуществ в нем над условными г-стратегами (*Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, и *Gemmatimonadetes*) к-стратегов (*Alpha-* и *Deltaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* и *Acidobacteria*). В пользу преобладания в почве П2 к-стратегов свидетельствуют и данные по меньшим потерям CO₂ из внесенной соломы, несмотря на ее большее разложение.

В качестве индикатора обеспеченности почвы доступным органическим веществом предлагается использовать соотношения филумов в П1 к аналогичным в П2, которые стабильно (во все сроки) существенно ниже или выше в одной из почв. Так как среди представителей филумов

Chloroflexi, *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes* много олиготрофных микроорганизмов, то именно соотношение более копиотрофных филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* к вышеназванным олиготрофным и принято за индикатор.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ВНИИСХМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы были проведены за счет финансовой поддержки гранта РФФ 18-16-00073.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агрохимические методы исследования почв / Под ред. Соколова А.В. М., 1975. 656 с.
2. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. СПб., 2011. 27 с.
3. Бакина Л.Г. Роль фракций гумусовых веществ в почвенно-экологических процессах. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб., 2012. 50 с.
4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. 256 с.
5. Заварзина А.Г., Данченко Н.Н., Демин В.В., Артемьева З.С., Козут Б.М. Гуминовые вещества – гипотезы и реальность (обзор) // Почвоведение. 2021. № 12. С. 1449–1480. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21120169>
6. Еськов А.И., Лукин С.М., Тарасов С.И. Методические подходы к оценке гумусного состояния почв при длительном применении различных систем удобрений // Методы исследований органического вещества почв. М., 2005. С. 111–134.
7. Коростик Е.В., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А. и др. Универсальные 16S rRNA праймеры для описания генетического разнообразия сообщества почвенных прокариот // Экологическая генетика. 2006. № 4(4). С. 33–38.
8. Козут Б.М. Принципы и методы оценки содержания трансформируемого органического вещества в пахотных почвах // Почвоведение. 2003. № 3. С. 308–316.
9. Козут Б.М., Яшин М.А., Семенов В.М., Авдеева Т.Н., Маркина Л.Г., Лукин С.М., Тарасов С.И. Распределение трансформированного органического вещества в структурных отдельностях дерново-подзолистой супесчаной почвы // Почвоведение. 2016. № 1. С. 52–64. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1601007X>
10. Новицкий М.В., Илющенко В.А. Содержание и состав лабильного гумуса в дерново-подзолистых супесчаных почвах разной степени окультуренности // Агрехимия. 1997. № 4. С. 19–22.
11. Орлова О.В. Кинетический метод оценки содержания в почве и удобрениях органического углерода, доступного для микроорганизмов // Сб. докл. Междунар. науч.-пр. конф. “Агроэкологические функции органического вещества почв и использование органических удобрений и биоресурсов в ландшафтном земледелии”. Владимир, 1–5 июля 2004 г. С. 103–106.
12. Паников Н.С., Горбенко А.Ю., Светлов С.В. Способ определения суммарного содержания водорастворимых органических веществ в почве. Пат. № 1318909 (СССР) МКП G 01 N 33/24. 1887.
13. Сафонов А.П. К методике подготовки образцов почв для определения гумуса // Гумус и азот в земледелии нечерноземной зоны РСФСР. Л., 1987. С. 14–16.
14. Семенов А.М., Семенов В.М., Ван Бругген А.Х.К. Диагностика здоровья и качества почвы // Агрехимия. 2011. № 12. С. 4–20.
15. Семенов В.М., Лебедева Т.Н., Зинякова Н.Б., Хромычкина Д.П., Соколов Д.А., де Гереню Л.В.О., Кравченко И.К., Ли Х., Семенов М.В. Зависимость разложения органического вещества почвы и растительных остатков от температуры и влажности в длительных инкубационных экспериментах // Почвоведение. 2022. № 7. С. 860–875. <https://doi.org/10.31857/S0032180X22070085>
16. Семенов В.М., Тулина А.С. Сравнительная характеристика минерализуемого пула органического вещества в почвах природных и сельскохозяйственных экосистем // Агрехимия. 2011. № 12. С. 53–63.
17. Справочник по анализу органических удобрений / Под ред. А.И. Еськова М., 2000. 221 с.
18. Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Агропромиздат, 1987. 239 с.
19. Тулина А.С., Семенов В.М. Оценка чувствительности минерализуемого пула почвенного органического вещества к изменению температуры и влажности // Почвоведение. 2015. № 8. С. 952–952. <https://doi.org/https://doi.org/10.7868/S0032180X15080109>
20. Чекмарев П.А. Состояние плодородия почв и мероприятия по его повышению в 2012 г. // Агрехимический вестник. 2012. № 1. С. 2–4.
21. Шарков И.Н. Концепция воспроизводства гумуса в почвах // Агрехимия. 2011. № 12. С. 21–27.
22. Шеин Е.В., Милановский Е.Ю. Роль и значение органического вещества в образовании и устойчивости почвенных агрегатов // Почвоведение. 2003. № 1. С. 53–61.
23. Шульц Э., Кершенс М. Характеристика разлагаемой части органического вещества почв и ее трансформации при помощи экстракции горячей водой // Почвоведение. 1998. № 7. С. 890–894.
24. Birch H.F. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability // Plant and soil. 1958. № 10(1). P. 9–31.
25. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nature Biotechnology. 2019. № 37. P. 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
26. Cleveland C.C., Nemergut D.R., Schmidt S.K., Townsend A.R. Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition // Biogeochemistry. 2007. № 82(3).

- P. 229–240.
<https://doi.org/10.1007/s10533-006-9065-z>
27. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 7. P. 5069–5072.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
 28. Fierer N., Bradford M.A., Jackson R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria // Ecology. 2007. № 88(6) P. 1354–1364.
<https://doi.org/10.1890/05-1839>
 29. Gregorich E.G., Beare M.H., McKim U.F., Skjemstad J.O. Chemical and biological characteristics of physically uncomplexed organic matter // Soil Sci. Soc. Am. J. 2006. № 70. P. 975–985.
 30. Haynes R.J. Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand // Soil Biol. Biochem. 2000. V. 32. № 2. P. 211–219.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00148-0)
 31. Jarvis P., Rey A., Petsikos C., Wingate L., Rayment M., Pereira J., Banza J. et al. Drying and wetting of Mediterranean soils stimulates decomposition and carbon dioxide emission: the “Birch effect” // Tree Physiology. 2007. V. 27. P. 929–940.
 32. Janzen H.H. Beyond carbon sequestration: soil as conduit of solar energy // Eur. J. Soil Sci. 2015. V. 66. P. 19–32.
 33. Li H., Yang S., Semenov M.V., Yao F., Ye J., Bu R. et al. Temperature sensitivity of SOM decomposition is linked with a K-selected microbial community // Global Change Biol. 2021. V. 27. № 12. P. 2763–2779.
 34. Pascault N., Nicolardot B., Bastian F., Thiébeau P., Ranzard L., Maron P.A. In situ dynamics and spatial heterogeneity of soil bacterial communities under different crop residue management // Microbial Ecology. 2010. V. 60. P. 291–303.
<https://doi.org/10.1007/s00248-010-9648-z>
 35. Paul E.A., Morris S.J., Conant R.T., Plante A.F. Does the Acid Hydrolysis–Incubation Method Measure Meaningful Soil Organic Carbon Pools? // Soil Sci. Soc. Am. J. 2006. № 70. P. 1023–1035.
<https://doi.org/10.2136/SSSAJ2005.0103>
 36. Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open-source tool for metagenomics // Peer J. 2016. V. 4. P. e2584.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
 37. Schlesinger W.H., Andrews J.A. Soil respiration and the global carbon cycle // Biogeochemistry. 2000. V. 48. № 1. P. 7–20.
<https://doi.org/10.1023/A:1006247623877>
 38. Schmidt S.K., Costello E.K., Nemergut D.R., Cleveland C.C., Reed S.C., Weintraub M.N., Martin A.M. Microbial turnover and seasonal succession drive biogeochemical cycles in the alpine // Ecology. 2007. V. 88. P. 1379–1385.
 39. Trivedi P., Anderson I.C., Singh B.K. Microbial modulators of soil carbon storage: integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction // Trends in Microbiology. 2013. V. 21. № 12. P. 641–651.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.09.005>
 40. West A.W., Sparling G.P. Modification to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of different water contents // J. Microbiol. Meth. 1986. № 5. P. 177–189.
[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(86\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0167-7012(86)90012-6)
 41. Wickings K., Grandy S., Reed S., Johnson N. The origin of litter chemical complexity during decomposition // Ecology Lett. 2012. № 15(10). P. 1180–1188.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01837>
 42. Yang S., Wu H., Wang Z., Semenov M.V., Ye J., Yin L., Wang X. et al. Linkages between the temperature sensitivity of soil respiration and microbial life strategy are dependent on sampling season // Soil Biol. Biochem. 2022. V. 172. P. 108758.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108758>

Soil Bacterial Community during Straw Decomposition Depending on the Amount of Available Organic Matter

O. V. Orlova^{1, *}, A. A. Kichko¹, E. L. Chirak², A. O. Zverev¹, T. O. Lisina¹, and E. E. Andronov^{1, 3}

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Sant Petersburg, 196608 Russia

²ATG Service Gen LLC, St. Petersburg, 199178 Russia

³Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, 119017 Russia

*e-mail: falenki@hotmail.com

The properties and functions of soils are largely determined by the amount of available organic matter, which is most significant for the vital activity of microorganisms. The influence of the content of soil available organic matter on the composition and functioning of the microbial community during the transformation of barley straw in the soil is considered. A soddy-podzolic soil (Umbric Albic Retisols (Abruptic)), layer 0–20 cm, was incubated (t 25°C, 60% TFC) for 4 months and a model soil with a reduced content of available organic matter was obtained. Next, a laboratory experiment was carried out with the introduction of barley straw into native and model soil. In dynamics (0, 7, 40, and 70 days), soil respiration, microbial biomass (SBI), the number of microorganisms, and the taxonomic composition of the microbial community (16S-rRNA sequencing) were analyzed. The quality of soil organic matter was assessed by the content of total organic carbon (C_{tot}) and its fractions: available (C_{avail}), water-soluble (C_{wat}), labile (C_{lab}). It has been shown that in the

model soil the amount of C_{wat} and C_{avail} decreases by half in the absence of significant differences in the content of C_{tot} . In addition, there was a visible deterioration in the aggregate structure of the soil and an acceleration in the transformation of straw in it (25% more than in the native one). The taxonomic composition of the soil bacterial community was influenced by the amount of available organic matter in the soil, the addition of straw, and the time of incubation. A decrease in the content of available organic matter changes the composition of the microbial community: the proportions of the phyla Acidobacteria and Firmicutes decrease, while the proportions of Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, and archaea increase. It was revealed that the dominant part (50% of the total) of the microbial community of the depleted soil is characterized by great diversity and oligotrophy. Indicators are proposed for comparing soils by the oligotrophy of the microbial community based on the taxonomic composition.

Keywords: soddy-podzolic soil (Umbric Albic Retisols (Abruptic)), succession of microbial community, oligotrophic soil, 16S rRNA

УДК 631.46

ВЛИЯНИЕ ВНЕСЕНИЯ СОЛОМЫ НА СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОМА
ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ© 2023 г. Д. А. Никитин^а, * (ORCID: 0000-0002-8533-6536),М. В. Семенов^а (ORCID: 0000-0001-6811-5793), Н. А. Ксенофонтова^а (ORCID: 0000-0003-1317-5101),
А. К. Тхакахова^а (ORCID: 0000-0001-9375-2364), И. В. Русакова^б, С. М. Лукин^б^аПочвенный институт им. В.В. Докучаева, Пыжжевский пер., 7, стр. 2, Москва, 119017 Россия^бВсероссийский научно-исследовательский институт органических удобрений и торфа – филиал
“Верхневолжский ФАНЦ”, Вяткино, Судогодский р-н, Владимирская обл., Прянишникова ул., 2, 601390 Россия

*e-mail: dimnik90@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Потеря органического вещества почвы при сельскохозяйственном использовании земель оказывает негативное влияние на ее свойства и является одним из серьезных факторов роста концентрации CO₂ в атмосфере. Доступным способом одновременного восстановления запасов почвенного органического вещества и депонирования секвестрированного углерода является внесение соломы в почву. Целью исследования была оценка влияния соломы на количественные показатели различных групп микроорганизмов дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol) в рамках длительного полевого эксперимента. Многократное (суммарно 42 т/га) внесение соломы зерновых и зернобобовых культур в 1.25–2 раза повышало содержание углерода микробной биомассы (C_{мик}) в пахотном слое, наибольший рост биомассы отмечен в вариантах без удобрений. Базальное дыхание и дыхательный коэффициент (qCO₂) увеличивались в ряду: контроль < NPK < NPK + солома < солома. Применение минеральных удобрений снижало qCO₂, биомассу грибов и численность копий генов архей в 1.5–3.0 раза. Соотношение грибы/бактерии по методу люминесцентной микроскопии изменялось от 4 до 15, а по результатам количественной ПЦР – от 0.17 до 0.33. Минимальные значения соотношений грибы/бактерии характерны для вариантов с внесением минеральных удобрений, а максимальные – с заделкой соломы. Таким образом, систематическое поступление свежего органического вещества соломы является важным технологическим приемом для повышения микробиологической активности почвы и нивелирования негативного влияния минеральных удобрений на почвенную микробиоту.

Ключевые слова: углерод микробной биомассы, базальное дыхание, соотношение грибы/бактерии, количественная ПЦР, минеральные удобрения

DOI: 10.31857/S0032180X22601189, EDN: IEEOCD

ВВЕДЕНИЕ

Почвенное органическое вещество (ПОВ) представляет собой резервуар углерода, азота и других питательных элементов для растений, поддерживая агроэкологические функции почвы [17, 31]. Потеря органического углерода (C_{орг}) при сельскохозяйственном использовании земель оказывает негативное влияние на физические, химические и биологические свойства почв и является одним из наиболее серьезных факторов, ведущих к их деградации [25, 57, 61]. Доступным способом одновременного восстановления запасов ПОВ и депонирования секвестрированного углерода является внесение растительных остатков в почву [14, 15, 21, 25, 40, 42]. Наиболее распространенным и доступным для использования

типом растительных остатков является солома [26, 55, 59, 61], внесение которой обеспечивает повторное вовлечение в биогеохимический круговорот до 50% азота, фосфора и калия и поступление нескольких тонн на гектар органического вещества [14, 25, 37, 41]. Кроме того, в связи с экономическим развитием солома сельскохозяйственных культур превратилась из ценного сырья и корма для скота в органические отходы, требующие утилизации [37, 42]. Практикуемое сжигание соломы недопустимо с природоохранных позиций. Таким образом, заделывание соломы в почву позволяет решить одновременно три задачи: компенсировать потери ПОВ, утилизировать растениеводческие отходы и повысить плодородие почвы [25, 40].

Почва является олиготрофной средой, в которой подавляющая часть микроорганизмов обитает в условиях дефицита субстрата [28, 47]. Послеуборочные растительные остатки зерновых и зернобобовых культур характеризуются повышенным содержанием целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, являясь энергетическим субстратом для гетеротрофных микроорганизмов [16, 41]. При внесении растительных остатков в почву происходит увеличение эмиссии CO_2 и биомассы почвенных микроорганизмов [4, 59, 61, 63]. Таким образом, заделка соломы, как агротехнологический прием биологизации земледелия, активизирует почвенную микробиоту [47], что, с одной стороны, повышает микробный пул ПОВ, но, с другой стороны, может активизировать прайминг-эффект дополнительной минерализации $\text{C}_{\text{орг}}$ [25, 55, 61].

Внесение растительных остатков является важным приемом почвенной секвестрации углерода, составляя в среднем $168 \pm 67 \text{ кг C/га год}$ [52]. Сохранность секвестрируемого с растительными остатками органического вещества во многом определяется численностью и структурой почвенного микробного сообщества, в том числе соотношением грибы/бактерии [10, 24, 43, 49, 50]. Преобладание микобиоты и высокие значения отношения грибы/бактерии обычно выявляют в почвах с повышенной секвестрирующей способностью и более низкими значениями C/N [43, 49, 50, 55]. Уменьшение отношения грибы/бактерии указывает на снижение секвестрирующей способности почв [34, 43].

Применение минеральных удобрений является обязательным условием получения высоких урожаев [31, 36], но их внесение, чаще всего, негативно отражается на микробиологических показателях почвы [22, 30, 31, 35]. Обнаружено уменьшение таксономического разнообразия прокариот и грибов в почве и ризосфере удобренных сельскохозяйственных растений [20, 30, 46, 48, 62]. Можно предположить, что совместное внесение минеральных удобрений и соломы будет не только устранять негативные эффекты, но и оптимизировать численность и структуру почвенных микроорганизмов.

Цель работы – оценка влияния свежего органического вещества соломы на численность клеток и копий рибосомальных генов, а также величину и структуру биомассы различных групп микроорганизмов в дерново-подзолистой почве в условиях длительного полевого эксперимента.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Почва. Исследования проводили с образцами агродерново-подзолистой супесчаной почвы (Umbric Retisol), отобранными в многолетнем полевом опыте, заложенном в 1997 г. на опытном поле Все-

российского научно-исследовательского института органических удобрений и торфа (ВНИИОУ) – филиале ФГБНУ “Верхневолжский ФАНЦ” в Судогодском районе Владимирской области ($56^{\circ}3'16'' \text{ N}$, $40^{\circ}29'28'' \text{ E}$), в пятипольном зерно-пропашном севообороте: озимая пшеница, люпин (на зерно), картофель, ячмень, однолетние травы (люпин + овес). Условия проведения длительных опытов ВНИИОУ подробно описаны в работе [7]. Климат территории умеренно континентальный с теплым летом (средняя температура июля $+18^{\circ}\text{C}$) и умеренно холодной зимой (средняя температура января -12°C). Среднегодовое количество осадков составляет от 500 до 550 мм.

Для проведения данного исследования выбрали следующие варианты опыта: контроль без удобрений (V1 и V5); N54P51K57 (среднегодовая доза) (V2 и V6); N54P51K57 + солома озимой пшеницы, люпина, ячменя по 3 т/га (V3 и V7); солома озимой пшеницы, люпина, ячменя по 3 т/га (V4 и V8). Суммарно с начала полевого опыта в пахотный слой почвы в вариантах V3, V4, V7, V8 внесено 42 т/га соломы. Площадь делянок составляла 42–47 м². Минеральные удобрения вносили ежегодно весной под предпосевную культивацию. Солому измельчали во время уборки зерна комбайном АМПО-500, равномерно распределяли по площади делянок согласно схеме опыта и заделывали в верхний слой 0–10 см тяжелой дисковой бороной. Через 3–4 нед. производили вспашку с равномерным распределением в толще 0–20 см прокомпостированной соломы [14]. Образцы почвы для анализов отбирали в агроценозе ячменя в июне (1-й срок отбора, V1–V4) и августе (V5–V8) из слоя 0–15 см в трехкратной повторности. Почвенные пробы для микробиологических анализов отбирали с соблюдением требований по контролю контаминации. Пробы почвы для определения биомассы микроорганизмов хранили в стерильных емкостях в течение месяца в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, а для молекулярно-генетических анализов – в морозильной камере при -70°C . Для определения химических свойств почв использовали воздушно-сухие образцы.

Химические свойства почвы. Содержание органического углерода ($\text{C}_{\text{орг}}$) и общего азота ($\text{N}_{\text{общ}}$) в почве определяли на автоматическом HCNS-анализаторе Leco 932 (США). Величины водного pH почвы измеряли потенциометрическим способом при соотношении почва/вода, равном 1/2.5. Содержание подвижных соединений фосфора ($\text{P}_{\text{подв}}$) и калия ($\text{K}_{\text{подв}}$) определяли по методу Кирсанова.

Определение углерода микробной биомассы, базального дыхания и метаболического коэффициента. Углерод микробной биомассы ($\text{C}_{\text{мик}}$) оценивали методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД) [3]. Навеску почвы помещали во флакон и

добавляли водный раствор глюкозы. Обогащенный образец почвы инкубировали (3.5–5 ч, +22°C) и измеряли концентрацию CO₂ на газовом хроматографе КристаллЛюкс 4000М (Россия). Углерод микробной биомассы рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{мик}} (\text{мкг С/г почвы}) = \\ = \text{СИД} (\text{мкл С-CO}_2 / (\text{г почвы ч})) \times 40.04 + 0.37.$$

Базальное дыхание (БД) определяли так же, как СИД, только вместо раствора глюкозы в почву добавляли дистиллированную воду. Время инкубации флаконов с почвой 24 ч. Скорость БД выражали в мкг С-CO₂/(г почвы ч).

Микробный дыхательный коэффициент ($q\text{CO}_2$) рассчитывали по формуле:

$$\text{БД}/C_{\text{мик}} = q\text{CO}_2 (\text{мкг С-CO}_2 / (\text{мг С}_{\text{мик}} \text{ ч})).$$

Биомассу прокариот оценивали с помощью метода люминесцентной микроскопии с применением флуоресцентного красителя акридина оранжевого (микроскоп Биомед 5 ПР ЛЮМ (Россия)) при увеличении 1000× с масляной иммерсией [5]. Десорбцию клеток с почвы проводили при помощи ультразвуковой установки УЗДН-1 (2 мин, сила тока 0.40 А, частота 22 кГц). Число клеток прокариот на 1 г субстрата рассчитывали по формуле:

$$N = S_1 a n / V S_2 C,$$

где N – число клеток на 1 г субстрата; S_1 – площадь препарата, мкм²; a – количество клеток в одном поле зрения (усреднение производится по всем препаратам); n – показатель разведения прокариотной смеси, мл; V – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; C – навеска субстрата, г. Длину актиномицетного мицелия в 1 г образца (NMA) определяли по формуле:

$$\text{NMA} = S_1 a n / v S_2 c \times 10^6,$$

где S_1 – площадь препарата, мкм²; a – средняя длина фрагментов актиномицетного мицелия в поле зрения, мкм; n – показатель разведения суспензии, мл; v – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; c – навеска образца, г. Количество биомассы прокариот на грамм сухой почвы рассчитывали с учетом ее влажности.

Биомассу грибов определяли методом люминесцентной микроскопии с применением флуоресцентного красителя калькофлуора белого [5]. Учет спор и длины мицелия осуществляли на люминесцентном микроскопе Биомед 5 ПР ЛЮМ (Россия) при увеличении 400×. Десорбцию клеток с почвы проводили при помощи вортекса

MSV-3500 (Латвия) при скорости 3500 об./мин в течение 10 мин. Расчет количества грибных спор на 1 г субстрата вели по формуле:

$$M = [(4an)/p] \times 10^{10},$$

где M – количество спор в 1 г почвы; a – среднее число спор в поле зрения; p – площадь поля зрения, мкм²; n – показатель разведения. Длину грибного мицелия в 1 г образца, NMA определяли по формуле:

$$\text{NMA} = S_1 a n / v S_2 c \times 10^6,$$

где S_1 – площадь препарата, мкм²; a – средняя длина фрагментов мицелия в поле зрения, мкм; n – показатель разведения суспензии, мл; v – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; c – навеска образца, г. Грибную биомассу (мг/г почвы) рассчитывали, полагая, что плотность спор равна 0.837 г/см³, а плотность мицелия – 0.628 г/см³ [11]. Содержание грибной биомассы на грамм сухой почвы рассчитывали с учетом ее влажности.

Экстракция тотальной ДНК из почвы и количественная ПЦР в реальном времени. Тотальную ДНК выделяли из 0.25 г образцов почвы с использованием набора DNeasy PowerSoil ProKit (Qiagen, Германия) и гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) при скорости 6500 об./мин в течение 40 с. Количественную оценку содержания рибосомальных генов микроорганизмов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для амплификации целевых участков ДНК разных групп микроорганизмов использовали следующие праймеры: Eub338/Eub518 – для бактерий, arc915f/arc1059r – для архей, ITS1f/5.8S – для грибов [46, 48]. Проводили калибровку зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов, по которой определяли численность копий генов в образцах с помощью программного обеспечения CFX Manager. В качестве контроля для бактерий использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона *Escherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*, для грибов – *Saccharomyces cerevisiae* Meyen 1 B-D1606. Реакцию проводили по следующему протоколу: 1) +95°C – 3 мин; 2) денатурация двухцепочечной ДНК при +95°C – 10 с; 3) отжиг праймеров на матрице при +50°C – 10 с; 4) удлинение цепи ДНК при +72°C – 20 с; 5) считывание значений флуоресценции, 49-кратное повторение этапов 2–5. Анализ кривых плавления проводили для проверки размера амплифицированных продуктов. ПЦР проводили для трех повторностей образца с пересчетом на средние значения содержания копий генов в грамме почвы.

Таблица 1. Основные химические свойства агродерново-подзолистой почвы

Индекс	Срок отбора	Наличие соломы	Наличие удобрений	C _{орг}	N _{общ}	C/N	pH _{водн}	N-NH ₄	P _{подв}	K _{подв}
				%						
V1	Июнь	—	—	0.55	0.06	9.2	6.29	5.07	98	54
V2		—	+	0.60	0.06	9.7	5.81	7.36	170	107
V3		+	+	0.67	0.07	9.9	5.49	8.50	173	107
V4		+	—	0.70	0.06	11.2	5.72	6.86	105	67
V5	Август	—	—	0.49	0.05	9.2	5.99	5.79	106	64
V6		—	+	0.62	0.07	9.0	5.76	5.57	160	88
V7		+	+	0.65	0.06	10.0	5.57	6.21	158	81
V8		+	—	0.72	0.06	11.8	5.78	5.14	114	62

Статистический анализ и визуализация экспериментальных данных проводили в программной среде R 4.2.1. Соответствие экспериментальных данных нормальному распределению проверяли критерием Шапиро—Уилка ($p > 0.05$). Для оценки различий между средними значениями разных вариантов эксперимента осуществляли дисперсионный анализ методом One-Way ANOVA с проверкой нормальности распределения ошибок, гомогенности дисперсий и идентичности размера выборок. Поправку на множественные сравнения делали с помощью *post-hoc* теста Тьюки. Силу и достоверность связей между химическими и микробиологическими свойствами почв оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона. В качестве поправки на множественные сравнения использовали поправку Холма—Бонферрони. Для многомерного анализа данных использовали метод главных компонент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химические свойства почвы. Внесение минеральных удобрений и соломы приводило к незначительному уменьшению pH по сравнению с контролем (табл. 1). Содержание C_{орг} изменялось от 0.49 в вариантах с минеральными удобрениями до 0.72% в образцах с соломой. Содержание N_{общ} варьировало от 0.05 до 0.07%, отношение C/N находилось в диапазоне от 9.0 до 11.8. Для обоих сроков отбора выявлено увеличение C/N, C_{орг} и N_{общ} в ряду: контроль < NPK < NPK + солома < солома. Содержание K_{подв} менялось от 54 до 107 мг/кг; P_{подв} — от 98 до 173 мг/кг; аммонийного азота — от 5.07 до 8.5 мг/кг. Минимальные значения K_{подв} и P_{подв} отмечены для контроля, а максимальные — для вариантов NPK и NPK + солома.

Значения углерода микробной биомассы (C_{мик}) варьировали от 109 до 265 мкг С/г почвы (рис. 1). Увеличение значений C_{мик} происходило только в вариантах с заделыванием соломы, причем наи-

большой рост биомассы (1.25–2 раза) отмечен в вариантах без внесения минеральных удобрений. Таким образом, подтверждается гипотеза о том, что заделывание в почву соломы повышает углерод микробной биомассы [26, 45, 59]. Подобный существенный рост значений C_{мик} выявлен для второго срока отбора образцов. В целом, наблюдалось последовательное увеличение содержания C_{мик} в ряду: контроль < NPK < NPK + солома < солома. Определяющими факторами уровня биомассы микроорганизмов в проанализированных почвах были срок отбора ($F = 504, p < 0.0001$) и заделка соломы ($F = 136, p < 0.0001$).

Для вариантов первого срока отбора заделка соломы увеличивала содержание C_{мик} почти в 2 раза, в то время как внесение минеральных удобрений и одновременное добавление к почве соломы с NPK приводило к росту углерода микробной биомассы лишь на 5–10% по сравнению с контролем. Данный результат говорит об ингибировании части микробного сообщества минеральными удобрениями и подтверждается в предыдущих исследованиях [30, 48, 54]. Значения C_{мик} в образцах второго срока отбора были идентичны (в случае контроля и NPK) либо выше (на 20% для варианта NPK + солома и на 30% для варианта с заделыванием соломы без минеральных удобрений) по сравнению с результатами для аналогичных вариантов первого срока. Таким образом, свежее органическое вещество соломы стимулировало рост микробной биомассы и нивелировало ингибирующее действие минеральных удобрений, что отмечено в работах [29, 47]. Следует подчеркнуть, что величины углерода микробной биомассы в почвах значительно варьировали в зависимости от срока отбора, что характерно и для модельных экспериментов с внесением в почву соломы [54].

С помощью метода люминесцентной микроскопии определена структура биомассы микроорганизмов. Суммарная биомасса прокариот (одноклеточных и мицелиальных) составляла от 1.07 до 2.96 мкг/г почвы. Биомасса одноклеточных про-

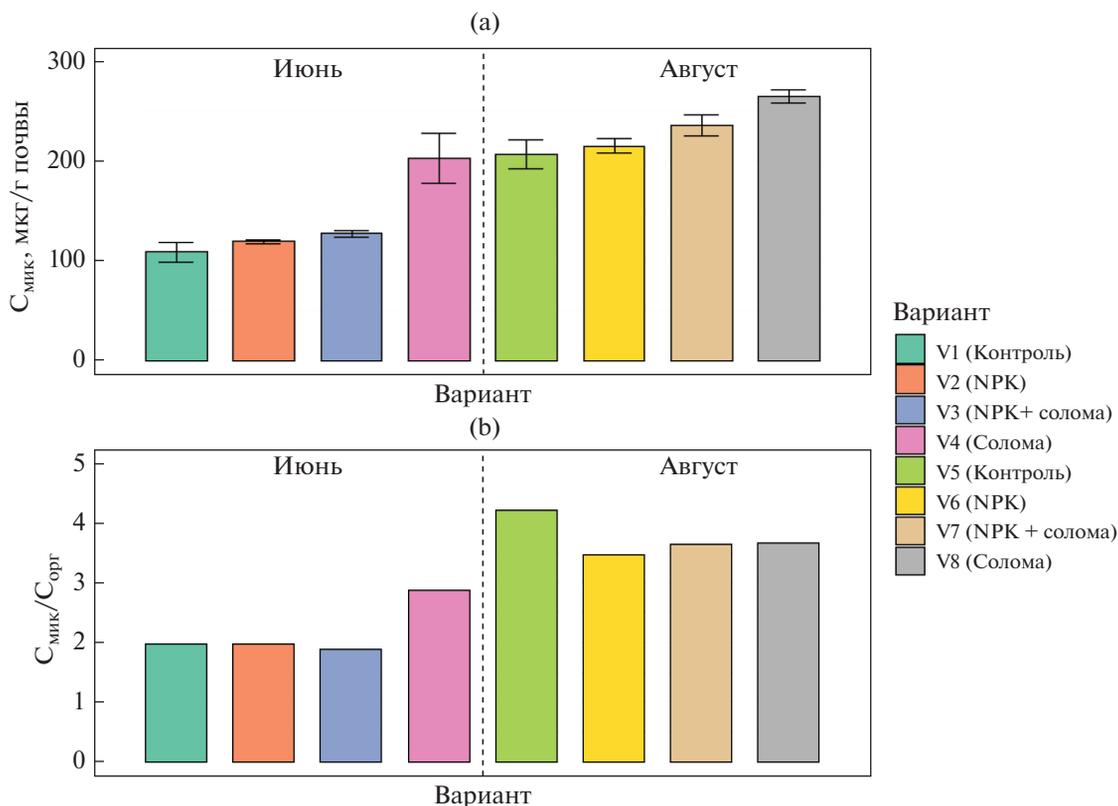


Рис. 1. Углерод микробной биомассы (а) и ее доля в общем органическом углероде почвы (б).

кариот варьировала от 0.86 до 2.78 мкг/г почвы, а численность их клеток — от 4.00×10^8 до 1.32×10^9 кл./г почвы соответственно (табл. 2). Минимальные значения выявлены для контроля, а максимальные — для варианта NPK + солома. Полученные результаты сопоставимы с данными для широкого спектра дерново-подзолистых почв средней полосы России [12] и были в 1.5–2 раза выше, чем численность клеток прокариот в серых лесных и аллювиально-луговых почвах юга Московской области [18].

Доля мицелия актиномицетов в биомассе прокариот варьировала от 5% для вариантов с минеральными удобрениями и соломой до 21% для варианта с соломой второго срока отбора и контроля. Биомасса прокариот в большинстве образцов была представлена, преимущественно, одноклеточными формами. Длина актиномицетных гиф коррелировала с его долей в биомассе прокариот и составляла от 1.79 до 20.47 м/г почвы. Доля мелких клеток (наноформ) прокариот, которые включены в общую численность прокариот, была незначительна и увеличивалась от 3 до 8% в ряду: контроль < NPK < NPK + солома < солома.

Биомасса грибов изменялась от 90 в варианте с минеральными удобрениями и соломой до 250 мкг/г почвы в контроле. Полученные значения биомас-

сы грибов в 1.5 раза меньше, чем в залежных дерново-подзолистых почвах Московской области [8], но в 1.5–2 раза больше по сравнению таковыми для темно-гумусовых лесных почв Костромской области [13]. Доля мицелия — активного компонента грибной биомассы — варьировала от 31.6 до 77.3%. Наименьшая длина грибных гиф (33.9 м/г почвы) выявлена в варианте с внесением минеральных удобрений, а наибольшая (119.59 м/г почвы) — в варианте с внесением соломы. Все показатели, характеризующие биомассу грибов, снижались ко второму сроку отбора. Внесение минеральных удобрений уменьшало длину мицелия микобиоты, как и в других исследованиях [34], а присутствие соломы, наоборот, увеличивало данный показатель. В целом, длина мицелия грибов в изученных вариантах была сопоставима с таковой для залежных дерново-подзолистых почв Московской области [8], но была почти в 3 раза меньше, чем для залежных выщелоченных черноземов Нижегородской области [12]. Численность одноклеточных грибных пропагул (спор и дрожжей) в образцах составляла 10^5 – 10^6 кл./г почвы.

Соотношение $C_{\text{мик}}/C_{\text{орг}}$ варьировало от 1.89 в варианте NPK + солома до 4.22 в контроле, с преобладанием в первом сроке отбора. Данный показатель характеризует физиологическое состояние

Таблица 2. Структура биомассы почвенных микроорганизмов

Индекс	Срок отбора	Наличие соломы	Наличие удобрений	Грибы												Прокариоты							Суммарная биомасса микроорганизмов (грибы и прокариот)
				мицелий (преимущественно $d = 3 \text{ мкм}$)			споры (диаметр, мкм)						общая биомасса спор, мкг/г почвы	доля мелких (2–3 мкм) спор по массе, %	суммарная биомасса грибов, мкг/г почвы	численность клеток прокариот, $\times 10^9$ кл./г почвы	биомасса одноклеточных прокариот, мкг/г почвы	длина актиноцепного мицелия, м/г почвы	биомасса актиноцепного мицелия, мкг/г почвы	доля мицелия актиноцептов в биомассе прокариот, %	общая биомасса прокариот, мкг/г почвы		
				Биомасса, мкг/г почвы	длина, м/г почвы	доля мицелия грибов, %	2		3		5												
							численность, шт/г почвы $\times 10^4$	масса, мкг/г почвы	численность, шт/г почвы $\times 10^4$	масса, мкг/г почвы	численность, шт/г почвы $\times 10^3$	масса, мкг/г почвы											
V1	Июнь	-	-	121 ± 22	82.65 ± 14.88	48.4	9.92 ± 1.79	34 ± 6	6.45 ± 1.16	75 ± 14	2.08 ± 0.37	20 ± 4	129 ± 23	84.5	250 ± 45	0.40 ± 0.07	0.86 ± 0.15	5.73 ± 1.03	0.21 ± 0.04	19.63 ± 3.53	1.07 ± 0.19	251.07 ± 45	
V2		-	+	49 ± 9	33.9 ± 6.10	31.6	13.81 ± 2.49	47 ± 8	4.52 ± 0.81	52 ± 9	0.69 ± 0.12	7 ± 1	106 ± 19	93.4	155 ± 28	0.51 ± 0.09	1.09 ± 0.20	20.47 ± 3.68	0.76 ± 0.14	41.08 ± 7.39	1.85 ± 0.33	156.85 ± 28	
V3		+	+	80 ± 14	55.14 ± 9.93	62.5	8.64 ± 1.56	29 ± 5	1.61 ± 0.29	19 ± 3	-	-	48 ± 9	100	128 ± 23	0.50 ± 0.09	1.07 ± 0.19	2.24 ± 0.40	0.08 ± 0.01	6.96 ± 1.25	1.15 ± 0.21	129.15 ± 23	
V4		+	-	174 ± 31	119.59 ± 21.53	77.3	73.40 ± 13.21	25 ± 5	2.26 ± 0.41	26 ± 5	-	-	51 ± 9	100	225 ± 41	0.57 ± 0.10	1.22 ± 0.22	1.79 ± 0.32	0.07 ± 0.01	5.43 ± 0.98	1.29 ± 0.23	226.29 ± 42	
V5	Август	-	-	74 ± 13	58.72 ± 10.57	41.6	11.21 ± 2.02	38 ± 7	4.51 ± 0.81	66 ± 11	-	-	104 ± 19	100	178 ± 32	0.77 ± 0.14	1.62 ± 0.29	13.89 ± 2.50	0.51 ± 0.09	23.94 ± 4.31	2.13 ± 0.38	180.13 ± 33	
V6		-	+	52 ± 9	41.25 ± 7.43	38.2	8.19 ± 1.47	28 ± 5	3.82 ± 0.69	56 ± 10	-	-	84 ± 15	100	136 ± 24	1.04 ± 0.19	2.20 ± 0.40	3.73 ± 0.67	0.14 ± 0.03	5.98 ± 1.08	2.34 ± 0.42	138.34 ± 25	
V7		+	+	66 ± 12	52.03 ± 9.36	73.3	6.04 ± 1.09	20 ± 4	2.78 ± 0.50	40 ± 8	-	-	24 ± 4	100	90 ± 16	1.32 ± 0.24	2.78 ± 0.50	4.78 ± 0.86	0.18 ± 0.03	6.08 ± 1.09	2.96 ± 0.53	92.96 ± 17	
V8		+	-	108 ± 19	85.11 ± 15.32	45.4	9.92 ± 1.79	34 ± 6	6.59 ± 1.19	96 ± 17	-	-	130 ± 23	100	238 ± 43	0.56 ± 0.10	1.19 ± 0.21	8.36 ± 1.50	0.31 ± 0.06	20.67 ± 3.72	1.50 ± 0.27	239.5 ± 43	

Примечание. $n = 5$, \pm — стандартное отклонение.

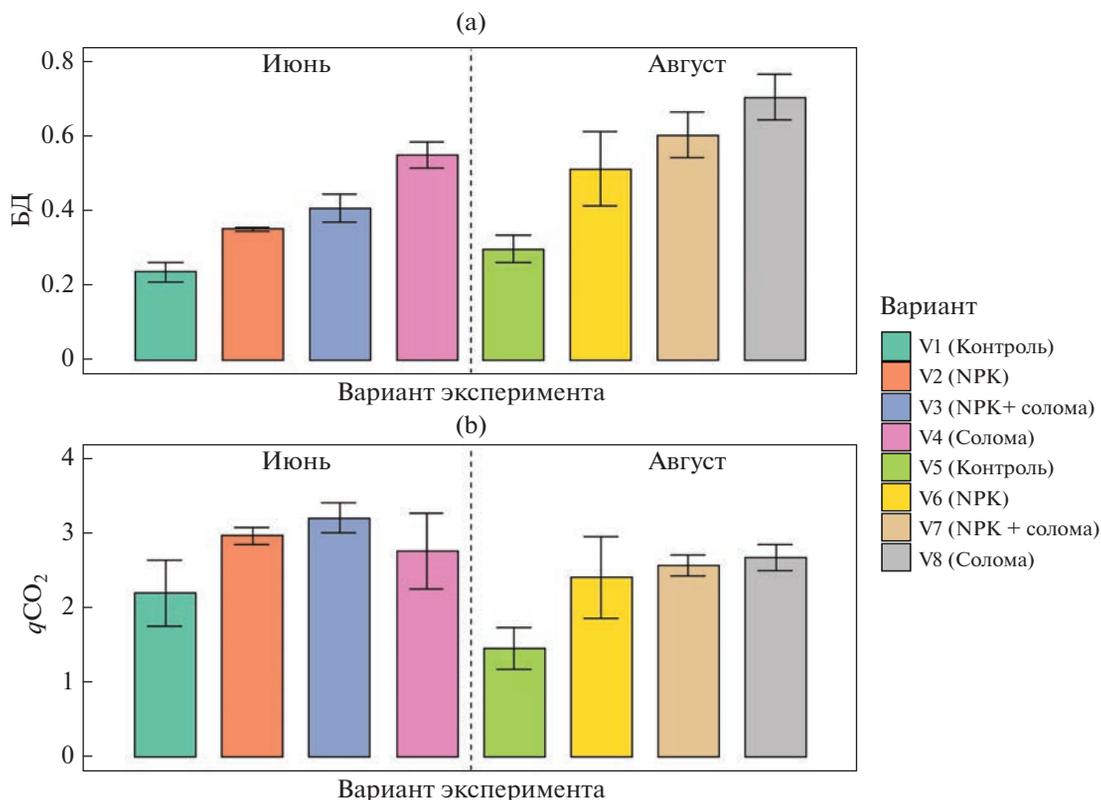


Рис. 2. Активность базального дыхания микроорганизмов ($\mu\text{г C-CO}_2/\text{г ч}$) (а) и величины дыхательного коэффициента ($\mu\text{г C-CO}_2/(\text{мг C}_{\text{мик}} \text{ч})$) (б).

почвенного микробиома и является индикатором доступности почвенного углерода для микроорганизмов [1, 10]. Уменьшение значений этого соотношения в почве указывает на тенденцию к стабилизации ПОВ и наличие экологических условий, препятствующих потреблению субстрата микроорганизмами [18, 23].

Активность базального дыхания почвенных микроорганизмов варьировала от 0.24 в 0.71 $\mu\text{г C-CO}_2/(\text{г ч})$ (рис. 2), что соответствует значениям для пахотных дерново-подзолистых почв Костромской области [2]. Для обоих сроков отбора образцов отмечено повышение БД в ряду контроль < NPK < NPK + солома < солома. Во второй срок отбора активность БД повышалась по сравнению с первым отбором для всех образцов. Факторами, определяющими интенсивность БД, в первую очередь являлась заделка соломы ($F = 145$, $p < 0.0001$), срок отбора образцов ($F = 69$, $p < 0.0001$) и внесение минеральных удобрений ($F = 63$, $p < 0.0001$).

Для обоих сроков отбора внесение свежего органического вещества соломы приводило к резкому росту (в 2.5 раза) значений БД по сравнению с контролем, что соответствует результатам других исследований [61]. Одновременное внесение соломы с минеральными удобрениями также по-

вышло БД по сравнению с контролем, но давало меньший эффект (в 1.7–2 раза). Таким образом, внесение минеральных удобрений значительно снижает БД, индуцированное при добавлении растительных остатков в почву. Такой вывод подтверждают другие исследования [38]. Ранее продемонстрирована большая отрицательная корреляция между внесением NPK и содержанием $\text{C}_{\text{мик}}$ по сравнению с БД [27]. Судя по результатам нашей работы, внесение минеральных удобрений снижает интенсивность роста $\text{C}_{\text{мик}}$, вызванную заделыванием соломы [27, 40].

Значения **дыхательного коэффициента ($q\text{CO}_2$)** изменялись от 1.46 до 3.2, что характерно для пахотных дерново-подзолистых почв средней полосы России [15]. В среднем для двух сроков отбора характерна тенденция к увеличению значений $q\text{CO}_2$ в ряду: контроль < NPK < солома < NPK + солома. Таким образом, подтверждена гипотеза об увеличении дыхательного коэффициента при заделке соломы [15, 58]. Для $q\text{CO}_2$ определяющими факторами являлись внесение минеральных удобрений ($F = 27$, $p < 0.0001$), срок отбора образцов ($F = 19$, $p < 0.0001$) и внесение соломы ($F = 18$, $p < 0.0001$).

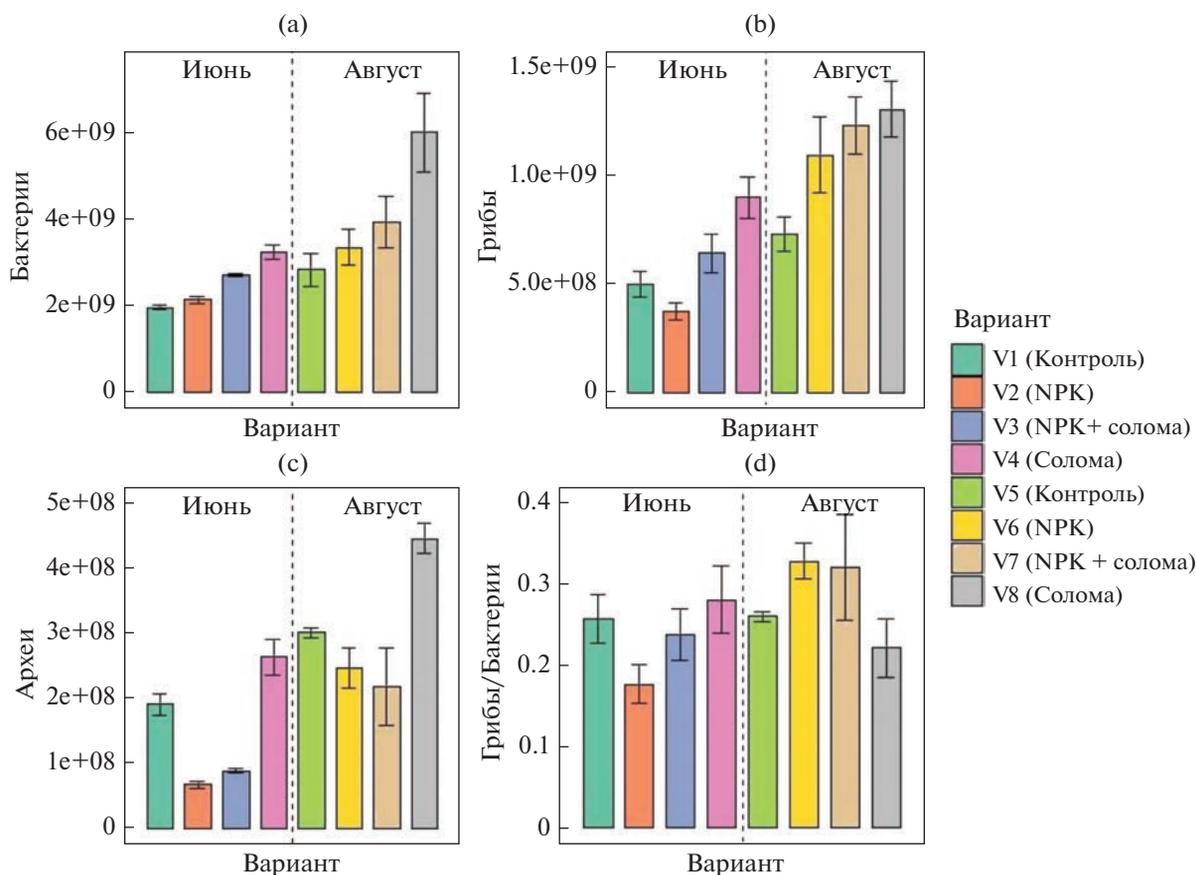


Рис. 3. Численность генов микроорганизмов в почве методом количественной ПЦР (копий генов/г почвы): бактерии (а), грибы (б), археи (с), соотношение грибы/бактерии (д).

Численность копий рибосомальных генов архей варьировала в диапазоне от 6.75×10^7 до 4.44×10^8 копий генов/г почвы; численность генов бактерий – от 1.96×10^9 до 5.98×10^9 копий генов/г почвы; численность генов грибов – от 3.74×10^8 до 1.31×10^9 копий генов/г почвы (рис. 3). Применение соломы значительно повышало численность копий генов грибов и бактерий до 2 раз, а также архей до 1.5 раз. Данные результаты по порядку значений соответствовали таковым для сельскохозяйственных почв южной Бразилии с внесением соломы [44].

Внесение минеральных удобрений резко (в 1.5–3 раза) снижало численность архей по сравнению с контрольным вариантом, в том числе в варианте NPK + солома. При этом внесение соломы позволяло нивелировать негативное воздействие минеральных удобрений на микобиоту, что показано и в других работах [44, 48]. Численность копий рибосомальных генов бактерий не зависела от применения минеральных удобрений.

Главным фактором, в наибольшей степени оказывающим влияние на численность копий генов всех рассматриваемых групп микроорганиз-

мов, был срок отбора образцов ($F = 174$ для архей, $F = 72$ для бактерий и $F = 122$ для грибов; для всех вариантов $p < 0.0001$) (рис. 4). Применение соломы оказывало ведущее влияние на численность бактерий и грибов ($F = 62$, $p < 0.0001$), а количество копий генов архей в значительной степени определялось внесением минеральных удобрений ($F = 163$, $p < 0.0001$).

Полученные значения численности копий генов 16S рРНК архей и бактерий, а также ITS грибов были на 1–2 порядка ниже, чем для агрочерноземов Ставропольского края [9] и серых лесных почв юга Московской области [18]. Положительный эффект от внесения свежего органического вещества растительных остатков на численность генов почвенных микроорганизмов был показан ранее в длительных полевых экспериментах в Швеции [56].

Соотношение грибы/бактерии. По результатам люминесцентной микроскопии в микробной биомассе почвы доминировали грибы, доля которых колебалась от 79.7% для варианта NPK + солома до 94.0% в контроле. Соответственно, соотношение грибы/бактерии по методу люминесцент-

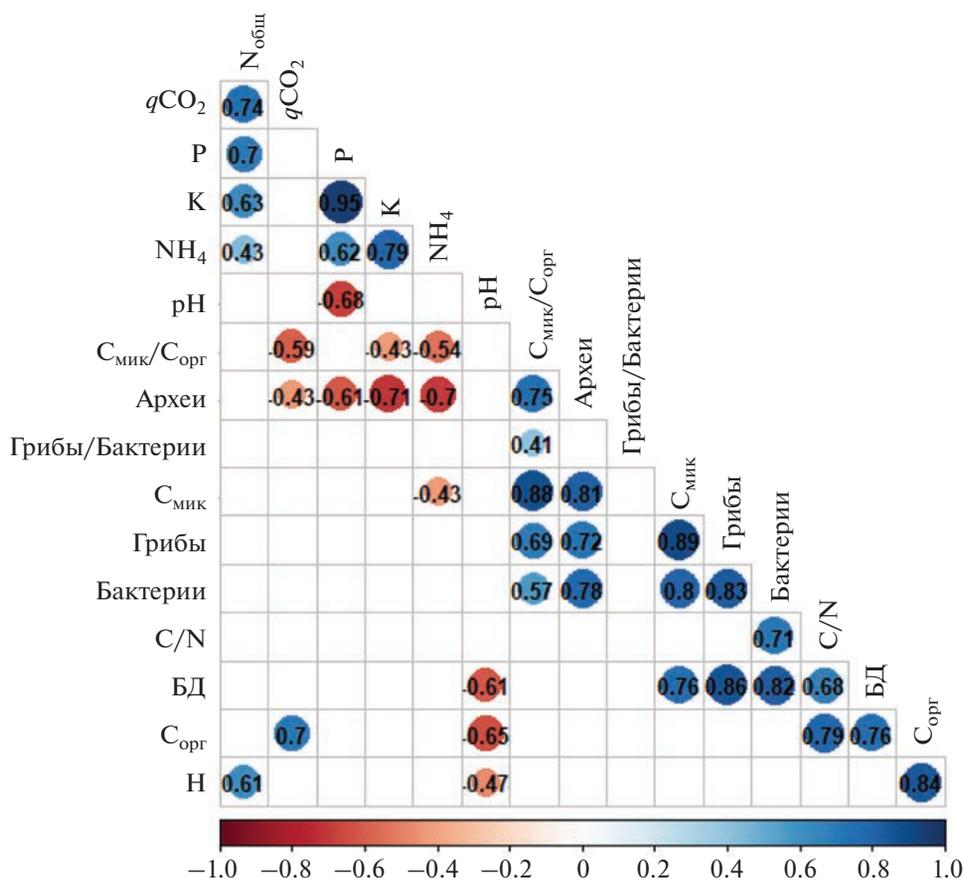


Рис. 4. Матрица корреляций между химическими и микробиологическими свойствами почв. Числами указаны коэффициенты корреляции. Значения приведены только для коэффициентов корреляции с $p < 0.05$.

ной микроскопии изменялось от 4 в вариантах с NPK и NPK + солома до 15 в вариантах с заделыванием соломы и контроле. Однако по результатам количественной ПЦР соотношение грибы/бактерии варьировало в диапазоне от 0.17 в вариантах с минеральными удобрениями до 0.33 в варианте с соломой. Факторами, в наибольшей степени определяющими соотношение грибы/бактерии, были срок отбора образцов ($F = 35$, $p < 0.0001$) и внесение минеральных удобрений ($F = 30$, $p < 0.0001$).

По двум примененным методам (люминесцентная микроскопия и количественная ПЦР) получены сильно отличающиеся значения соотношений грибы/бактерии в почвах. В первую очередь это обусловлено тем, что количественная ПЦР не отражает информацию о количестве клеток и биомассе микроорганизмов, в отличие от метода люминесцентной микроскопии. Для разных таксонов содержание рибосомальных генов неодинаково и может варьировать в диапазоне от 1 до 16 [19, 51]. Кроме того, за счет мицелиального строения в клетках грибов содержится гораздо меньше ДНК на единицу биомассы по сравнению с прокариотами [39].

Матрица корреляций между химическими и биологическими свойствами почв. Интенсивность БД характеризовалась высокой положительной корреляцией с количеством копий генов грибов ($r = 0.88$) и бактерий ($r = 0.83$), а также $C_{\text{мик}}$ и $C_{\text{орг}}$ ($r = 0.76$). $C_{\text{мик}}$ положительно коррелировал с количеством копий генов грибов ($r = 0.89$), архей ($r = 0.81$) и бактерий ($r = 0.80$). Таким образом, хотя численность копий генов микроорганизмов не тождественна $C_{\text{мик}}$, эти показатели характеризуются высокой положительно корреляцией, поэтому численность генов прокариот и грибов может являться хорошим дополнительным микробиологическим индикатором состояния почв.

Отрицательная корреляция обнаружена между численностью копий генов архей и содержанием аммонийного азота ($r = -0.70$), а также между $q\text{CO}_2$ и отношением $C_{\text{мик}}/C_{\text{орг}}$ ($r = -0.59$). Негативное влияние аммонийного азота на численность копий генов архей может быть связано с тем, что преобладающей среди них группой являются представители филума Thaumarchaeota, развитие которых происходит в условиях низких концентраций аммония [19, 32]. Кроме того, в

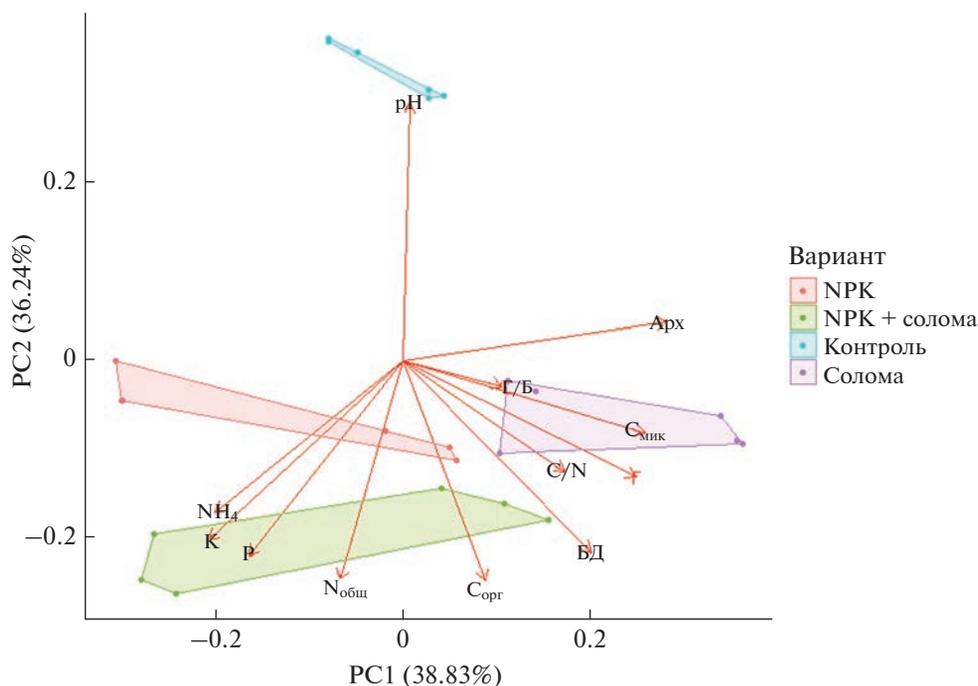


Рис. 5. Многомерный анализ данных по методу главных компонент.

случае окисления аммония археи и бактерии выступают конкурентами за ресурсы [32]. Внесение соломы в почву существенно стимулирует нитрификацию аммонийного азота археями филума *Thaumarchaeota*, по сравнению с аммонийоксиляющими бета- и гаммапротеобактериям [56, 60].

Метод главных компонент. На основе анализа химических и микробиологических показателей агродерново-подзолистой почвы, рассмотренные варианты были разделены на 4 непересекающихся кластера (рис. 5). Внесение соломы способствовало росту значений C/N , $C_{мик}$, численности грибов и соотношению грибы/бактерии. Соотношение грибы/бактерии связывают с углеродсеквестрирующей способностью почвы: рост грибной биомассы и соотношений грибы/бактерии положительно сказывается на накоплении ПОВ [43, 55]. При этом следует отметить уменьшение прироста грибной биомассы при совместном внесении соломы и минеральных удобрений [29]. Тем не менее, большинство рассмотренных микробиологических показателей агродерново-подзолистой почвы ($C_{мик}/C_{орг}$, биомасса прокариот, БД, численность копий рибосомальных генов микроорганизмов) по отдельности характеризовалось значительным временным варьированием, которое часто оказывало даже больший эффект по сравнению с внесением соломы или минеральных удобрений [31]. Этот факт подчеркивает зависимость функционирования микробного сообщества почвы от гидротермических условий и стадии вегетации растений. Например, отмечены

различия в величинах целлюлазной активности в почве под вико-овсяной смесью, выращиваемой в мае и сентябре [6]. Кроме того, следует иметь в виду возможность волнообразной динамики целлюлазной активности и численности прокариотов и микромицетов со строгой зависимостью числа и пиков осцилляций от внесения минеральных или органических удобрений [6, 33, 53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многократная заделка соломы оказывала положительное действие на большинство микробиологических параметров агродерново-подзолистой почвы. Минеральные удобрения, напротив, уменьшали величину qCO_2 , биомассу грибов и численность копий генов 16S рРНК архей. Поэтому заделка свежего органического вещества соломы может быть использована для повышения микробиологической активности почвы и ее плодородия, а также для устранения негативного влияния минеральных удобрений на почвенную микробиоту. Для части микробиологических показателей ($C_{мик}$, $C_{мик}/C_{орг}$, биомасса прокариот, БД, численность копий генов 16S рРНК бактерий и ITS рРНК грибов) фактор временной динамики превышал влияние как минеральных удобрений, так и соломы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 21-76-10025.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ананьева Н.Д., Благодатская Е.В., Демкина Т.С.* Оценка устойчивости микробных комплексов к природным и антропогенным воздействиям // Почвоведение. 2002. № 5. С. 580–587.
2. *Ананьева Н.Д., Стольников Е.В., Сусьян Е.А., Ходжаева А.К.* Грибная и бактериальная микробная биомасса (селективное ингибирование) и продуцирование CO₂ и N₂O дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов // Почвоведение. 2010. № 11. С. 1387–1393.
3. *Ананьева Н.Д., Сусьян Е.А., Гавриленко Е.Г.* Особенности определения углерода микробной биомассы почвы методом субстрат-индуцированного дыхания // Почвоведение. 2011. № 11. С. 1327–1333.
4. *Благодатская Е.В., Семенов М.В., Якушев А.В.* Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016.
5. *Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 302 с.
6. *Лаврентьева Е.В., Семенов А.М., Зеленев В.В., Чжун Ю., Семенова Е.В., Семенов В.М., Намсараев Б.Б., Ван Бругген А.К.Х.* Ежедневная динамика целлюлазной активности в пахотной почве в зависимости от обработки // Почвоведение. 2009. № 8. С. 952–961.
7. *Лукин С.М.* История научных исследований по плодородию почв и применению удобрений (к 105-летию с образования Судогодского опытного поля ФГБНУ ВНИИОУ) // История науки и техники. 2018. № 3. С. 3–17.
8. *Никитин Д.А., Чернов Т.И., Железова А.Д., Тхакахова А.К., Никитина С.А., Семенов М.В., Ксенофонтова Н.А., Кутовая О.В.* Сезонная динамика биомассы микроорганизмов в дерново-подзолистой почве // Почвоведение. 2019. № 11. С. 1356–1364. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19110078>
9. *Никитин Д.А., Иванова Е.А., Железова А.Д., Семенов М.В., Гаджиумаров Р.Г., Тхакахова А.К., Чернов Т.И., Ксенофонтова Н.А., Кутовая О.В.* Оценка влияния технологии no-till и вспашки на микробиом южных агрочерноземов // Почвоведение. 2020. № 12. С. 1508–1520. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20120084>
10. *Никитин Д.А., Семенов М.В., Чернов Т.И., Ксенофонтова Н.А., Железова А.Д., Иванова Е.А., Хитров Н.Б., Степанов А.Л.* Микробиологические индикаторы экологических функций почв (обзор) // Почвоведение. 2022. № 2. С. 228–243. <https://doi.org/10.31857/S0032180X22020095>
11. *Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г.* Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // Почвоведение. 2005. № 6. С. 706–714.
12. *Полянская Л.М., Суханова Н.И., Чакмазян К.В., Звягинцев Д.Г.* Особенности изменения структуры микробной биомассы почв в условиях залежи // Почвоведение. 2012. № 7. С. 792–792.
13. *Полянская Л.М., Юмаков Д.Д., Тюгай З.Н., Степанов А.Л.* Соотношение грибов и бактерий в темно-гумусовой лесной почве // Почвоведение. 2020. № 9. С. 1094–1099. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20090129>
14. *Русакова И.В.* Влияние соломы зерновых и зернобобовых культур на содержание углерода, агрохимические свойства и баланс элементов питания в дерново-подзолистой почве // Агрохимический вестник. 2015. № 6. С. 6–10.
15. *Русакова И.В.* Микробиологические и экофизиологические параметры дерново-подзолистой почвы при длительном применении соломы и минеральных удобрений, их связь с урожайностью // Сельскохозяйственная биология. 2020. № 55(1). С. 153–162. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.1.153rus>
16. *Семенов В.М., Ходжаева А.К.* Агроэкологические функции растительных остатков в почве // Агрохимия. 2006. № 7. С. 63–81.
17. *Семенов В.М., Когут Б.М.* Почвенное органическое вещество. М.: ГЕОС, 2015. 233 с.
18. *Семенов В.М., Паутова Н.Б., Лебедева Т.Н., Хромычкина Д.П., Семенов Н.А., Лопес де Гереню В.О.* Разложение растительных остатков и формирование активного органического вещества в почве инкубационных экспериментов // Почвоведение. 2019. № 10. С. 1172–1184. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19100113>
19. *Семенов М.В.* Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // Журн. общ. биологии. 2019. № 80(6). С. 403–417. <https://doi.org/10.1134/S004445961906006X>
20. *Семенов М.В., Никитин Д.А., Степанов А.Л., Семенов В.М.* Структура бактериальных и грибных сообществ ризосферного и внекорневого локусов серой лесной почвы // Почвоведение. 2019. № 3. С. 355–369. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19010131>
21. *Семенов М.В., Манучарова Н.А., Краснов Г.С., Никитин Д.А., Степанов А.Л.* Биомасса и таксономическая структура микробных сообществ в почвах правобережья р. Оки // Почвоведение. 2019. № 8. С. 974–985. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19080124>
22. *Чернов Т.И., Семенов М.В.* Управление почвенными микробными сообществами: возможности и перспективы (обзор) // Почвоведение. 2021. № 12. С. 1506–1522.
23. *Angst G., Mueller K.E., Nierop K.G., Simpson M.J.* Plant- or microbial-derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter // Soil Biol. Biochem. 2021. V. 156. P. 108189. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108189>
24. *Bailey V.L., Smith J.L., Bolton H., Jr.* Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration // Soil Biol. Biochem. 2002. V. 34. P. 997–1007. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00033-0)

25. *Berhane M., Xu M., Liang Z., Shi J., Wei G., Tian X.* Effects of long-term straw return on soil organic carbon storage and sequestration rate in North China upland crops: A meta-analysis // *Global Change Biol.* 2020. V. 26. P. 2686–2701. <https://doi.org/10.1111/gcb.15018>
26. *Chen X., Liu M., Kuzyakov Y., Li W., Liu J., Jiang C., Meng Wu, Li Z.* Incorporation of rice straw carbon into dissolved organic matter and microbial biomass along a 100-year paddy soil chronosequence // *Appl. Soil Ecol.* 2018. V. 130. P. 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.06.004>
27. *Chen X., Xia Y., Rui Y., Ning Z., Hu Y., Tang H., He H., Li H., Kuzyakov Y., Ge T., Wu J., Su Y.* Microbial carbon use efficiency, biomass turnover, and necromass accumulation in paddy soil depending on fertilization // *Agriculture, Ecosystems Environment.* 2020. V. 292. P. 106816. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106816>
28. *Craine J., Elmore A.J., Wang L., Aranibar J., Bauters M., Boeckx P. et al.* Isotopic evidence for oligotrophication of terrestrial ecosystems // *Nature Ecology and Evolution.* 2018. V. 2. P. 1735–1744.
29. *Fan F., Yu B., Wang B., George T.S., Yin H., Xu D., Li D., Song A.* Microbial mechanisms of the contrast residue decomposition and priming effect in soils with different organic and chemical fertilization histories // *Soil Biol. Biochem.* 2019. V. 135. P. 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.001>
30. *Francioli D., Schulz E., Lentendu G., Wubet T., Buscot F., Reitz T.* Mineral vs. organic amendments: microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies // *Frontiers in Microbiology.* 2016. V. 7. P. 1446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01446>
31. *Han P., Zhang W., Wang G., Sun W., Huang Y.* Changes in soil organic carbon in croplands subjected to fertilizer management: a global meta-analysis // *Scientific Reports.* 2016. V. 6(1). P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep27199>
32. *He J.Z., Hu H.W., Zhang L.M.* Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 55. P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.06.006>
33. *He M., Ma W., Zelenev V.V., Khodzaeva A.K., Kuznetsov A.M., Semenov A.M., Semenov V.M., Blok W.W., van Bruggen A.H.C.* Short-term dynamics of greenhouse gas emissions and cultivable bacterial populations in response to induced and natural disturbances in organically and conventionally managed soils // *Appl. Soil Ecol.* 2017. V. 119. P. 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.011>
34. *Heděnc P., Nilsson L.O., Zheng H., Gundersen P., Schmidt I.K., Rousk J., Vesterdal L.* Mycorrhizal association of common European tree species shapes biomass and metabolic activity of bacterial and fungal communities in soil // *Soil Biol. Biochem.* 2020. V. 149. P. 107933. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107933>
35. *Geisseler D., Scow K.M.* Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review // *Soil Biol. Biochem.* 2014. V. 75. P. 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>
36. *Geng Y., Cao G., Wang L., Wang S.* Effects of equal chemical fertilizer substitutions with organic manure on yield, dry matter, and nitrogen uptake of spring maize and soil nitrogen distribution // *PLoS One.* 2019. V. 14. P. e0219512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219512>
37. *Jin Z., Shah T., Zhang L., Liu H., Peng S., Nie L.* Effect of straw returning on soil organic carbon in rice–wheat rotation system: A review // *Food and Energy Security.* 2020. V. 9(2). P. e200. <https://doi.org/10.1002/fes3.200>
38. *Iovieno P., Morra L., Leone A., Pagano L., Alfani A.* Effect of organic and mineral fertilizers on soil respiration and enzyme activities of two Mediterranean horticultural soils // *Biol. Fertil. Soils.* 2009. V. 45. P. 555–561. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0365-z>
39. *Landenmark H.K., Forgan D.H., Cockell C.S.* An estimate of the total DNA in the biosphere // *PLoS Biology.* 2015. V. 13. P. e1002168. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002168>
40. *Liang Y., Al-Kaisi M., Yuan J., Liu J., Zhang H., Wang L., Cai H., Ren J.* Effect of chemical fertilizer and straw-derived organic amendments on continuous maize yield, soil carbon sequestration and soil quality in a Chinese Mollisol // *Agriculture, Ecosystems Environment.* 2021. V. 314. P. 107403. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107403>
41. *Liu C., Lu M., Cui J., Li B., Fang C.* Effects of straw carbon input on carbon dynamics in agricultural soils: a meta-analysis // *Global Change Biology.* 2014. V. 20. P. 1366–1381. <https://doi.org/10.1111/gcb.12517>
42. *Lu F.* How can straw incorporation management impact on soil carbon storage? A meta-analysis // *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.* 2015. V. 20. P. 1545–1568. <https://doi.org/10.1007/s11027-014-9564-5>
43. *Malik A.A., Chowdhury S., Schlager V., Oliver A., Puisant J., Vazquez P.G., Jehlich N., Bergen M., Griffiths R.I., Gleixner G.* Soil fungal: bacterial ratios are linked to altered carbon cycling // *Frontiers in Microbiology.* 2016. V. 7. P. 1247. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01247>
44. *Morais M.C., Ferrari B.M., Borges C.D., Cherubin M.R., Tsai S.M., Cerri C.C., Cerri C.E.P., Feigl B.J.* Does sugarcane straw removal change the abundance of soil microbes? // *BioEnergy Research.* 2019. V. 12. P. 901–908. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10018-5>
45. *Saleem M., Law A.D., Sahib M.R., Pervaiz Z.H., Zhang Q.* Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome // *Rhizosphere.* 2018. V. 6. P. 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.02.003>
46. *Semenov M.V., Krasnov G.S., Semenov V.M., van Bruggen A.H.* Long-term fertilization rather than plant species shapes rhizosphere and bulk soil prokaryotic communities in agroecosystems // *Appl. Soil Ecol.* 2020. V. 154. P. 103641. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103641>
47. *Semenov M.V., Krasnov G.S., Semenov V.M., Ksenofontova N., Zinyakova N.B., van Bruggen A.H.* Does fresh

- farmyard manure introduce surviving microbes into soil or activate soil-borne microbiota? // *J. Environ. Management*. 2021. V. 294. P. 113018.
48. *Semenov M.V., Krasnov G.S., Semenov V.M., van Bruggen A.* Mineral and organic fertilizers distinctly affect fungal communities in the crop rhizosphere // *J. Fungi*. 2022. V. 8. P. 251.
<https://doi.org/10.3390/jof8030251>
49. *Six J., Frey S.D., Thiet R.K., Batten K.M.* Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2006. V. 70(2). P. 555–569.
<https://doi.org/10.2136/sssaj2004.0347>
50. *Soares M., Rousk J.* Microbial growth and carbon use efficiency in soil: Links to fungal-bacterial dominance, SOC-quality and stoichiometry // *Soil Biol. Biochem.* 2019. V. 131. P. 195–205.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.01.010>
51. *Suzuki M.T., Taylor L.T., DeLong E.F.* Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66(11). P. 4605–4614.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000>
52. *Tiefenbacher A., Sandén T., Haslmayr H.-P., Miloczki J., Wenzel W., Spiegel H.* Optimizing Carbon Sequestration in Croplands: A Synthesis // *Agronomy*. 2021. V. 11. P. 882.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11050882>
53. *van Bruggen A.H.C., He M., Zelenev V.V., Semenov V.M., Semenov A.M., Semenova E.V., Kuznetsova T.V., Khodzaeva A.K., Kuznetsov A.M., Semenov M.V.* Relationships between greenhouse gas emissions and cultivable bacterial populations in conventional, organic and long-term grass plots as affected by environmental variables and disturbances // *Soil Biol. Biochem.* 2017. V. 114. P. 145–159.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.07.014>
54. *Wang D., Zhu Z., Shahbaz M., Chen L., Liu S., Inubushi K., Wu J., Ge T.* Split N and P addition decreases straw mineralization and the priming effect of a paddy soil: a 100-day incubation experiment // *Biol. Fertil. Soils*. 2019. V. 55. P. 701–712.
<https://doi.org/10.1007/s00374-019-01383-6>
55. *Wang Y., Wu P., Mei F., Ling Y., Qiao Y., Liu C., Legharic S.J., Guan X., Wang T.* Does continuous straw returning keep China farmland soil organic carbon continued increase? A meta-analysis // *J. Environ. Management*. 2021. V. 288. P. 112391.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112391>
56. *Wessén E., Nyberg K., Jansson J.K., Hallin S.* Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management // *Appl. Soil Ecol.* 2010. V. 45. P. 193–200.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.003>
57. *Wu L., Zhang W., Wei W., He Z., Kuzyakov Y., Bol R., Hu R.* Soil organic matter priming and carbon balance after straw addition is regulated by long-term fertilization // *Soil Biol. Biochem.* 2019. V. 135. P. 383–391.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.06.003>
58. *Yan D., Long X.E., Ye L., Zhang G., Hu A., Wang D., Ding S.* Effects of salinity on microbial utilization of straw carbon and microbial residues retention in newly reclaimed coastal soil // *Eur. J. Soil Biol.* 2021. V. 107. P. 103364.
<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103364>
59. *Yang H., Fang C., Meng Y., Dai Y., Liu J.* Long-term ditch-buried straw return increases functionality of soil microbial communities // *Catena*. 2021. V. 202. P. 105316.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105316>
60. *Yansheng C., Fengliang Z., Zhongyi Z., Tongbin Z., Huayun X.* Biotic and abiotic nitrogen immobilization in soil incorporated with crop residue // *Soil Till. Res.* 2020. V. 202. P. 104664.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104664>
61. *Zhao X.M., He L., Zhang Z.D., Wang H.B., Zhao L.P.* Simulation of accumulation and mineralization (CO₂ release) of organic carbon in chernozem under different straw return ways after corn harvesting // *Soil Till. Res.* 2016. V. 156. P. 148–154.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2015.11.001>
62. *Zhao M., Zhao J., Yuan J., Hale L., Wen T., Huang Q., Vivanco J.M., Zhou J., Kowalchuk G.A., Shen Q.* Root exudates drive soil-microbe-nutrient feedbacks in response to plant growth // *Plant, Cell Environ.* 2021. V. 44. P. 613–628.
<https://doi.org/10.1111/pce.13928>
63. *Zhu L.Q., Li J., Tao B.R., Hu N.J.* Effect of different fertilization modes on soil organic carbon sequestration in paddy fields in South China: A meta-analysis // *Ecol. Indic.* 2015. V. 53. P. 144–153.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.038>

Effect of Fresh Organic Matter of Straw on Microbiological Parameters of Sod-Podzolic Soil

D. A. Nikitin¹*, M. V. Semenov¹, N. A. Ksenofontova¹, A. K. Tkhakakhova¹,
I. V. Rusakova², and S. M. Lukin²

¹Dokuchaev soil science institute, Moscow, 119017 Russia

²All-Russian Research Institute of Organic Fertilizers and Peat, Vyatkinno, 601390 Russia

*e-mail: dimnik90@mail.ru

The loss of soil organic matter (SOM) due to agricultural land use has a negative impact on soil properties and is one of the major contributors to the increase in atmospheric CO₂ concentrations. An appropriate way for simultaneous restoration of POM stocks and deposition of sequestered carbon is the straw application to the soil. The aim of the study was to evaluate the effect of straw on the quantitative indicators of

different groups of microorganisms in sod-podzolic soil (Umbric Retisol) in a long-term field experiment. Introduction of straw increased microbial biomass carbon (C_{mic}) by 1.25–2 times, with the greatest increase in microbial biomass observed in the variants without fertilizer. Basal respiration and respiration coefficient (qCO₂) increased in the row: control < NPK < NPK + straw < straw. Application of straw increased the gene copy number of fungi and bacteria up to 2 times and archaea up to 1.5 times. Mineral fertilizer application without straw reduced qCO₂, fungi biomass and archaeal gene copy number by 1.5–3.0 times. The fungi/bacteria ratio varied from 4 to 15 determined by fluorescent microscopy and from 0.17 to 0.33 by quantitative PCR. The lowest values of fungi/bacteria ratios were found in soils with the application of mineral fertilizers, and the highest – with the incorporation of straw. Thus, the regular introduction of fresh organic matter of straw is an important technological procedure to increase the microbiological activity of soil and leveling the negative impact of mineral fertilizers on soil microbiota.

Keywords: microbial biomass carbon, basal respiration, fungi/bacteria ratio, quantitative PCR, mineral fertilizers

ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В УСЛОВИЯХ
АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

УДК 502.53:631.46

ОБИЛИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ
ПЫЛЕАЭРОЗОЛЯ И ГОРОДСКИХ ПОЧВ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ

© 2023 г. Л. В. Лысак^{а, *}, С. А. Шоба^а, Т. В. Прокофьева^а,
А. М. Глушакова^{а, b}, Н. В. Гончаров^а, А. А. Белов^а

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^бНИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Малый Казенный пер., 5а, Москва, 105064 Россия

*e-mail: lvlysak@mail.ru

Поступила в редакцию 19.10.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Получена комплексная (количественная и качественная) характеристика прокариотных сообществ твердых атмосферных выпадений (пылеаэрозоля) и образцов почв на территории г. Москвы на участках с разной интенсивностью антропогенной нагрузки. Общая численность бактерий в исследованных образцах твердых атмосферных выпадений (ТАВ) была меньше численности бактерий в образцах почв; актиномицетный мицелий в образцах ТАВ не обнаружен, хотя отмечался в образцах почв. Численность сапротрофных культивируемых бактерий в образцах ТАВ была на порядок меньше, чем в поверхностных горизонтах урбаноземов и реплантозема, отобранных на тех же участках. Среди культивируемых бактерий в пылеаэрозолях преобладали бактерии рода *Micrococcus*, в почвах преобладали представители филума Proteobacteria. В образцах ТАВ обнаружены представители семейства Enterobacteriaceae среди которых имеются виды, являющиеся потенциальными патогенами человека. Максимальное видовое разнообразие бактерий семейства Enterobacteriaceae зафиксировано в образцах ТАВ, отобранных на участках с повышенной антропогенной и транспортной нагрузкой. Санитарно-показательная бактерия *Escherichia coli* обнаружена во всех образцах ТАВ, ее содержание варьировало от 10 до 100 КОЕ/г, что по степени эпидемической опасности характеризует ТАВ как умеренно опасные. Экологические индексы, рассчитанные для прокариотных сообществ *in situ* (баркодинг гена 16S рРНК), свидетельствуют о меньшем таксономическом разнообразии прокариотных сообществ ТАВ по сравнению с сообществами близко расположенных городских почв.

Ключевые слова: урбанозем (Urbic Technosol), реплантозем (Urbic Technosol), численность бактерий, ДНК-метабаркодинг, санитарное-состояние почв, экологические функции почв, атмосферный пылеаэрозоль

DOI: 10.31857/S0032180X22601359, EDN: IFETYW

ВВЕДЕНИЕ

Одним из приоритетных направлений современных экологических исследований урбанизированных территорий (мегаполисов) является мониторинг пылевого загрязнения воздушной среды [41]. Пыль все чаще оказывается в числе основных загрязнителей воздуха крупнейших городов [40].

Главными компонентами твердого аэрозоля атмосферы являются почвенно-породные частицы, поднимаемые с поверхности земли в результате эрозионных процессов, а также первичные биологические аэрозольные частицы — организмы (аэропланктон) или их остатки: клетки бактерий, споры грибов, живые клетки водорослей, одноклеточные животные и др. [28, 36]. Но большая часть исследований уличной пыли связана с

тем, что на территориях с активной антропогенной нагрузкой, куда можно причислить все мегаполисы мира, в составе атмосферного аэрозоля появляется множество загрязнителей минеральной и органической природы [30–34].

Тем не менее пылеаэрозоль является переносчиком не только сапротрофных микроорганизмов, но и возбудителей оппортунистических инфекций (потенциально патогенных микроорганизмов) и аллергенных видов микроорганизмов. Некоторые штаммы этих организмов могут проявлять устойчивость к известным, широко применяемым в медицине противомикробным средствам (антибиотикам) из-за горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам в микробных сообществах [16, 38]. В свою очередь антибиотикорезистентные штаммы микроорга-

низмов в окружающей человека атмосфере несут большую опасность для населения с ослабленным иммунитетом [17, 18, 26]. Несмотря на осуществляемый в обязательном порядке контроль показателей общей запыленности атмосферы в урбоэкосистемах (показатели PM_{2.5} и PM₁₀), роль твердых частиц в перемещении микроорганизмов в атмосфере и связь их с почвенными микроорганизмами изучена недостаточно [35].

Цель работы – изучение обилия и разнообразия прокариотных сообществ городской пыли и поверхностных горизонтов почв г. Москвы, на участках с различной антропогенной нагрузкой.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на территории г. Москва, расположенного в центре Восточно-Европейской равнины, сложенной рыхлыми мелкодисперсными отложениями преимущественно ледникового и водно-ледникового происхождения. Климат региона умеренно-континентальный с холодной снежной зимой и умеренно теплым летом [14]. Материал для исследований собрали летом 2021 г.

Участок 1 расположен в центральном округе города на ул. Льва Толстого и включает Дом-музей Льва Толстого в Хамовниках с примыкающим к нему садом и окрестными дворами с жилыми и офисными зданиями. Ул. Льва Толстого представляет собой однополосную дорогу, осуществляющую транзитную функцию между соседними микрорайонами. Степень автотранспортной нагрузки – средняя. Отбор проб проводили с подоконников, стен и элементов забора (1.5 м от поверхности). Тип функционального использования – рекреационный, общественно-деловой. Образцы поверхностного горизонта почв отбирали на участке, примыкающем с юго-востока к музею-усадьбе, из урбанозема легкосуглинистого с подсыпками компоста под газоном в 5 м от дорожного полотна.

Участок 2 расположен в западном административном округе г. Москвы вдоль ул. Вересаева и включает непосредственно саму улицу, часть территории Института минералогии, геохимии и кристаллохимии редких элементов РАН (ИМГРЭ РАН), а также примыкающие дворовые территории и сквер. Ул. Вересаева – однополосная дорога, заканчивающаяся тупиком, характеризуется низкой степенью автотранспортной нагрузки. Сбор проб пыли проводили с подоконников и стен зданий (1.5 м от поверхности). Тип функционального использования – жилой и общественно-деловой. Образцы почвы отбирали из верхнего горизонта урбанозема легкосуглинистого, вскрытого на территории института под газоном из злаков и рудеральных видов.

Участок 3 располагается в районе Дорогомилово в Западном административном округе г. Москвы на пересечении крупных автомагистралей города: Кутузовского проспекта и Третьего транспортного кольца (ТТК). ТТК – десятиполосная крупная транспортная артерия города, одна из трех основных кольцевых магистралей, характеризуется высокой степенью автотранспортной нагрузки. Участок обособлен от примыкающих территорий шумозащитными экранами. Пробы пыли отбирали с отбойников (0.7 м от поверхности), шумозащитных экранов (1.5 м от поверхности). Тип функционального использования – транспортный. Пробы почвы отбирали из верхнего горизонта реплантозема супесчаного на участке с газонной растительностью, расположенной над Кутузовским тоннелем.

Участок 4 расположен в Донском районе г. Москвы (на границе Южного и Центрального административных округов) вдоль Ленинского проспекта и включает территорию Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН), Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, а также соседние жилые здания, располагающиеся вдоль проспекта. Ленинский проспект – крупная десятиполосная автомагистраль, соединяющая периферию города с его центром. Степень автотранспортной нагрузки – высокая. Сбор пыли осуществляли с подоконников и выступающих элементов зданий (1.5 м от поверхности). Тип функционального использования – транспортный, общественно-деловой. Пробы ТАР собирали с помощью сметов с жестяных подоконников и других внешних элементов жилых зданий. Пробы почвы отбирали из урбанозема легкосуглинистого вскрытого на территории ИПЭЭ РАН.

Общую численность бактерий и длину актиномицетного мицелия определяли с помощью прямого люминесцентно-микроскопического метода с применением красителя акридина оранжевого. Учет численности прокариотных клеток проводили с использованием люминесцентного микроскопа ZEISS AxioScope 2+. Численность бактерий и длину актиномицетного мицелия рассчитывали по общепринятым формулам [5].

Определение численности и таксономической структуры культивируемых сапротрофных бактерий проводили при помощи посева на плотную питательную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду с добавлением нистатина для подавления роста микроскопических грибов [8]. Посевы изучали на 10–14 сут инкубации. Представителей отдельных морфотипов бактерий выделяли в чистые культуры и определяли до рода на основании микроморфологических, культуральных и некоторых физиолого-биохимических признаков. Культивируемые сапротрофные бактерии идентифици-

ровали в помощь определителя Берджи [21], ключа для определения родов почвенных бактерий [8], в некоторых случаях секвенированием гена 16S рРНК [19]. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Office Excel 2019.

Структуры сапротрофного бактериального комплекса определяли на основании критериев, разработанных на кафедре биологии почв МГУ им. М.В. Ломоносова [8]. Выделяли следующие группы обилия: доминанты (>30%), субдоминанты (20–30%), группа среднего обилия (10–20%) и минорные компоненты (<10%). Для более полной характеристики прокариотных сообществ исследованных образцов рассчитывали показатели обилия, проводили их сравнительный анализ. Кроме того, рассчитывали коэффициент Кожевина (k) [6], как отношение данных люминесцентной микроскопии (M , кл./г) к данным посевов на плотную питательную среду (P , кл./г):

$$k = \frac{M}{P}.$$

Содержание санитарно-показательных микроорганизмов в исследованных образцах изучали в соответствии с методическими указаниями Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России (МУ 2.1.7.730-99. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест). Определяли численность представителей семейства *Enterobacteriaceae*, наличие кишечной палочки (*Escherichia coli*), энтерококков (*Enterococcus* spp.), клостридий (*Clostridium* spp.) в соответствии с методическими рекомендациями [10, 11].

Идентификацию выделенных штаммов проводили молекулярно-генетическими методами на основании анализа нуклеотидных последовательностей варибельных участков V3–V4 региона гена 16S рРНК с последующим использованием базы данных NCBI BLAST. Для идентификации *Escherichia coli* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae* из образцов твердых атмосферных выпадений и почвы использовали посев на хромогенную высокоселективную среду Rebecca® EB (NF Validation EN ISO 16140).

Таксономическую структуру прокариотных сообществ *in situ* определяли методом высокопроизводительного секвенирования библиотек генов 16S рРНК с использованием платформы Illumina MiSeq методом парноконцевого чтения (2 × 300 пар оснований) с генерацией не менее 10000 парных прочтений на образец по последовательностям гена гиперварибельного региона V3–V4 16S рРНК. Подготовку образцов осуществляли по двухстадийной ПЦР: амплификацией фрагмента V3–V4 региона гена 16S рРНК и последующей амплификацией полученных ПЦР-продуктов с целью баркодирования библиотек. Полученные ДНК-библиотеки после очистки на магнитных частицах и

измерения концентрации флуориметрическим методом использовали в качестве матриц для высокопроизводительного секвенирования.

Данные высокопроизводительного секвенирования обрабатывали с использованием автоматизированного алгоритма QIIME [23], включающего объединение прямых и обратноконцевых прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрации последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных нуклеотидов (качество <Q20), фильтрации химерных последовательностей. Для разбиения последовательностей на операционные таксономические единицы использовали алгоритм с открытым референсным порогом классификации 97%. Выравнивание прочтений на последовательность 16S рРНК и распределение последовательностей по таксономическим единицам проводили с использованием базы данных Silva версии 132 [37].

Разнообразие и сходство бактериальных сообществ исследованных субстратов оценивали с помощью индексов α -разнообразия, рассчитанных при объединении полученных последовательностей в операционных таксономических единицах с уровнем сходства нуклеотидных последовательностей 97%.

Рассчитывали индексы разнообразия Шеннона и Пиелу. Более высокие значения индексов указывают на большее разнообразие [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение показателей общей численности бактерий в образцах ТАВ и верхних горизонтах почв. Общая численность бактерий в образцах пылеаэрозоля (ТАВ) варьировала от 1.5 до 4.7×10^9 кл./г. Максимальные показатели численности бактерий выявили в пылеаэрозолях, отобранных на участке 2 (ИМГРЭ), а минимальные – на участке 1 (Хамовники). Общая численность бактерий в образцах почвы варьировала от 3.9 до 8.2×10^9 кл./г, максимальная численность обнаружена в реплантоземе, отобранном на участке 3 (ТТК – газон над магистралью), минимальная – в урбаноэзме участка 4 (ИПЭЭ).

Во всех исследованных участках показатели общей численности бактерий в ТАВ были меньше, чем в почве. В образцах, отобранных на участках с высокой антропогенной нагрузкой (участки 1, 2 и 3), численность бактерий в почве была в 2.3–4.5 раза больше численности бактерий в ТАВ, а на участках с меньшей антропогенной нагрузкой (участок 4) эти показатели отличались мало (табл. 1).

Во всех исследованных образцах ТАВ актиномицетный мицелий не обнаружен, а в образцах урбаноэзем он выявлен в незначительном количестве 10–50 м/г только на участках 2 и 3. Можно

Таблица 1. Общая численность прокариот и численность сапротрофных бактерий в образцах твердых атмосферных выпадений и почв г. Москвы с участков 1–4

Показатель	Участок 1 Хамовники		Участок 2 ИМГРЭ		Участок 3 ТТК		Участок 4 ИПЭЭ	
	ТАВ	почва	ТАВ	почва	ТАВ	почва	ТАВ	почва
Общая численность прокариот, $\times 10^9$ кл./г \pm стандартная ошибка среднего; $n = 6$	1.5 ± 0.2	6.7 ± 0.7	4.7 ± 0.47	8.2 ± 0.82	2.8 ± 0.28	6.5 ± 0.65	3.4 ± 0.34	3.9 ± 0.4
Численность сапротрофного бактериального комплекса, $\times 10^6$ КОЕ/г стандартная ошибка среднего; $n = 5$	3.2 ± 0.3	17.9 ± 1.8	4.70 ± 0.47	10.25 ± 1.20	2.71 ± 0.28	31.54 ± 3.15	2.84 ± 0.28	19.51 ± 2.2
Коэффициент Кожевина (k)	469	376	1000	803.9	1037	206.4	1214	200

Примечание. n – повторность при определении показателей численности бактерий.

предположить, что в ТАВ актиномицеты присутствуют в виде спор, известно, что бактерии в атмосфере подвергаются большему воздействию УФ-лучей и высушиванию, чем в почве [28].

Численность и структура сапротрофного бактериального комплекса ТАВ и почв. Численность культивируемых сапротрофных бактерий в образцах ТАВ варьировала в диапазоне от 2.7 до 4.7×10^6 КОЕ/г почвы: максимальная численность зарегистрирована в пылеаэрозоле, собранном на участке 2. В почвах численность сапротрофных бактерий варьировала от 1.2 до 3.15×10^7 КОЕ/г почвы. Максимальная численность 3.2×10^7 КОЕ/г почвы зарегистрирована в урбаноземе, отобранном на участке 4. Численность сапротрофных бактерий во всех исследуемых образцах почв превышала их количество в образцах ТАВ в 5–10 раз. Полученные для почв величины близки значениям, характерным для верхнего горизонта почв умеренного пояса России [3, 7].

Обычно значения коэффициента k для верхних почвенных горизонтов колеблются от 200 до 500 с постепенным увеличением в десятки и сотни раз по мере углубления в почвенный профиль [6], что свидетельствует о нарастании численности олиготрофных бактерий и бактерий, которые находятся в жизнеспособном некультивируемом состоянии и не выделяются на обычных питательных средах. Коэффициент k , рассчитанный для ТАВ, колеблется в диапазоне 469–1214 ед., что сопоставимо с данными, полученными ранее для нижних горизонтов почв, и может свидетельствовать, что в пылеаэрозоле бактерии находятся в условиях ограниченного присутствия ростовых субстратов, возможно, что они пребывают в жизнеспособном, но некультивируемом состоянии.

Доминирующими в культивируемых сапротрофных бактериальных комплексах твердых атмосферных выпадений являлись бактерии рода *Micrococcus*, субдоминантные позиции занимали представители филума Proteobacteria, в основном бактерии родов *Mycobacterium* и *Cytophaga*. В образцах ТАВ выявлены культуры родов *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, занимающие минорные позиции.

В образцах урбаноземов и реплантозема доминировали бактерии филума Proteobacteria (бактерии родов *Mycobacterium*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Erwinia*); субдоминантами были актиномицеты рода *Streptomyces*. Среди культивируемых бактерий, выделенных из почв, идентифицированы представители родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Rhodococcus*.

Обращает на себя внимание преобладание (>30%) во всех образцах ТАВ бактерий филума Actinobacteria (главным образом, рода *Micrococcus*), что отмечалось многими авторами [28]. Большинство родов, выявленных в качестве группы среднего обилия и минорных компонентов, известно своей устойчивостью к высушиванию и другим неблагоприятным экологическим факторам [4, 20].

Значительное содержание актиномицетов (рода *Streptomyces*) и коринеподобных бактерий (рода *Arthrobacter*) в городских почвах показано ранее [9], что может быть связано с преимущественно щелочной реакцией среды городских почв.

Численность санитарно-показательных микроорганизмов в исследованных образцах ТАВ и городских почв. Обнаружение санитарно-показательных организмов и их высокое относительное обилие являются важным свидетельством антропогенной нагрузки на почву, а присутствие их в твердых ат-

Таблица 2. Относительное обилие отдельных видов культивируемых бактерий, выделенных из образцов ТАВ и городских почв на среде Ребесса, %

Вид	Участок 1 Хамовники		Участок 2 ИМГРЭ		Участок 3 ТТК		Участок № 4 ИПЭЭ	
	ТАВ	почва	ТАВ	почва	ТАВ	почва	ТАВ	почва
<i>Arthrobacter humicola</i>	0	0	0.55	2.3	0.2	0	0	0
<i>Arthrobacter ramosus</i>	0	1.65	0	1.8	0	0	4.35	0
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	0	0.85	0	0	0	0	1.55	0
<i>Bacillus frigoritolerans</i>	6.7	0	8.25	0	8.4	0	11.3	0
<i>Bacillus megaterium</i>	16.3	7.45	15.7	36.25	22.05	20.8	13.6	30.8
<i>Bacillus pumilus</i>	0	3.9	1.05	0	0	5.3	2.4	2.9
<i>Bacillus silvestris</i>	0	3.25	0.55	3.05	0.6	5.35	0.45	5.6
<i>Bacillus simplex</i>	0	0	0	0	0	4.8	1.8	2.1
<i>Bacillus sp. 1</i>	0	0	0	0	0	0	6.75	0
<i>Bacillus sp. 2</i>	0	0.45	7.65	5.3	6.85	10.9	1.55	6.2
<i>Citrobacter europaeus</i>	22.1	26.05	20.45	27.25	22.85	28.1	12.3	15.6
<i>Escherichia coli</i>	17.8	13.85	18.7	13.9	13.1	19.6	15.85	8.8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0.55	1.55	0	0	0	2.55	3.6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0.25	0	0	0	0	0	1.05	2.25
<i>Enterobacter cloacae</i>	5.8	2.25	0	0.55	6.1	0	7.25	8.05
<i>Enterobacter kobei</i>	0	0	0	0	0	0	0.4	0
<i>Klebsiella granulomatis</i>	2.05	1.1	7.6	6.4	7.05	0	3.6	3.75
<i>Klebsiella grimontii</i>	1.2	5.6	0	1.9	0.9	1.75	4.05	5.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0	0	0.55	1.6	1.6
<i>Klebsiella variicola</i>	0.8	0.6	1.7	0	0	0	1.35	1.25
<i>Microbacterium resistens</i>	0	0	0	0	0.45	0	0	0
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	6.65	2.6	0.75	0.4	0	0	2.15	2.4
<i>Rhodococcus equi</i>	13.1	5.15	0	0	0	0	2.05	0
<i>Rhodococcus fascians</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhodococcus soli</i>	0	22.9	12.6	0	5.9	0	1.05	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	0	2.9	0.7	4.2	0	0	0
<i>Staphylococcus sp.</i>	7.25	1.8	0	0.2	1.35	2.85	0	0

мосферных выпадениях говорит о вкладе бактерий, ассоциированных с человеком и животными. Известно, что накопление в городских почвах потенциально патогенных (представители семейства Enterobacteriaceae), а также потенциально аллергенных бактерий из родов *Rhodococcus* и *Micrococcus*, свидетельствует о серьезном нарушении экологических функций почвы, как “бактериального фильтра”, и может представлять опасность для здоровья человека. Представители флоры Proteobacteria, в значительных количествах обнаруженные в составе бактериального комплекса урбаноземов и ТАВ, на основании изучения микроморфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков были отнесены к семейству Enterobacteriaceae.

При помощи метода посева на селективную для санитарно-значимых бактерий питательную среду Ребесса из исследованных образцов были выделены представители семейства Enterobacteriaceae и некоторые сапротрофные бактерии. Всего было выделено 27 штаммов представителей родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*. Структура культивируемых комплексов, выделенных на среде Ребесса, представлена в табл. 2.

Стафилококки являются естественными резидентами кожи и слизистых оболочек. Они обнаружены на всех участках, которые захватывали жилую и общественную зоны города. Стафилококков (*Staphylococcus sciuri* и *Staphylococcus sp.*) в

Таблица 3. Показатели биологического разнообразия культивируемых бактериальных сообществ исследованных образцов

Индекс	Участок 1 Хамовники		Участок 2 ИМГРЭ		Участок 3 ТТК		Участок 4 ИПЭЭ	
	ТАВ	почва	ТАВ	почва	ТАВ	почва	ТАВ	почва
Шеннона, <i>H</i>	3.04	3.18	3.13	2.55	3.11	2.75	3.87	3.29
Пиелу, <i>E</i>	0.64	0.67	0.66	0.54	0.65	0.58	0.82	0.69

ТАВ, как правило, было больше, чем в почве. Полученные данные свидетельствуют, что высокое содержание потенциально-патогенных микроорганизмов в почве коррелирует с большой долей их в ТАВ. Максимальное видовое разнообразие бактерий семейства Enterobacteriaceae зафиксировано в образцах ТАВ, отобранных на участках с повышенной нагрузкой (центр города и транспортная зона): Хамовники и ТТК. Вероятно, что в зоне автотранспортного загрязнения почва хуже всего справляется с функцией самоочищения от потенциальных патогенов, что отражается на содержании этих организмов в ТАВ.

Индекс бактерий группы кишечной палочки во всех участках оценивали по наличию *Escherichia coli*. Это санитарно-показательный организм, постоянно обитающий в теле человека и теплокровных животных. Его присутствие в почве однозначно свидетельствует о наличии в ней выделений человека и/или животных; численность санитарно-показательных организмов прямо пропорциональна степени фекального загрязнения почвы. Для всех исследованных участков значение индекса находилось в пределах >10, но <100 КОЕ/г, т.е. почвы всех участков по оценке степени эпидемической опасности относятся к умеренно опасным. Для ТАВ нормативы по содержанию бактерий группы кишечной палочки в настоящее время не разработаны, но их численность в ТАВ сравнима или даже превышает содержание в почве. Следовательно, исследованные пылеаэрозоли можно рассматривать как умеренно опасные. Относительное обилие бактерий *Escherichia coli* практически во всех образцах ТАВ было больше, чем в образцах городских почв, а представителей рода *Citrobacter* больше в почве и меньше в ТАВ.

Общеизвестно, что многие почвенные микроорганизмы проявляют высокую устойчивость к антибиотикам [1]. В феврале 2017 г. ВОЗ опубликовала список микроорганизмов, наиболее устойчивых к антибиотикам. В этом списке представители семейства Enterobacteriaceae занимают одну из ведущих позиций. Основной представитель этой группы микроорганизмов — вид *Escherichia coli*, штаммы которого из пылеаэрозоля тестировали в настоящем исследовании. Они проявили наибольшую резистентность

к тикарциллин-клавуланату — антибиотику из группы пенициллины-клавулоновая кислота (ингибиторы β-лактамаз). Доля устойчивых штаммов составила 65.6%. Явление антибиотикорезистентности у микроорганизмов отмечается на всех континентах, но его распространенность во многом зависит от политики использования антибиотиков и существенно отличается в разных регионах [29].

На основании полученных данных о видовом разнообразии комплекса культивируемых бактерий рассчитывали экологические показатели, характеризующие видовое разнообразие бактериального комплекса (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о высоком разнообразии исследованных комплексов культивируемых сапротрофных бактерий. Значения индекса Шеннона варьировали в ТАВ от 3.04 до 3.87, в почвах от 2.55 до 3.29. Это свидетельствует о значительном таксономическом разнообразии комплексов, как ТАВ, так и городских почв. Обращает на себя внимание большее разнообразие комплексов ТАВ на участках 2, 3 и 4. Возможно, это связано с большим привнесением в них аллохтонных микроорганизмов с автомагистралей. Полученные большие значения индекса выравненности Пиелу в большинстве исследованных комплексов ТАВ также могут быть связаны с активным поступлением в них микроорганизмов из воздуха. В целом видовое разнообразие в ТАВ было больше в точках с максимальной антропогенной нагрузкой.

Таксономическая характеристика прокариотных сообществ образцов ТАВ и городских почв *in situ*. Характеристика филогенетического разнообразия прокариотного сообщества *in situ* образцов ТАВ и верхнего горизонта урбаназема на участке 1 (Хамовники) и реплантозема на участке 3 (ТТК) была произведена из-за их приуроченности к контрастным условиям по антропогенной нагрузке (рис. 1).

В исследованных образцах пылеаэрозолей и почв выявлено >10 филумов прокариот. Представители домена Archaea обнаружены только в образце верхнего слоя реплантозема (компостно-минеральный слой), отобранного на участке 3 (ТТК): все полученные последовательности принадле-

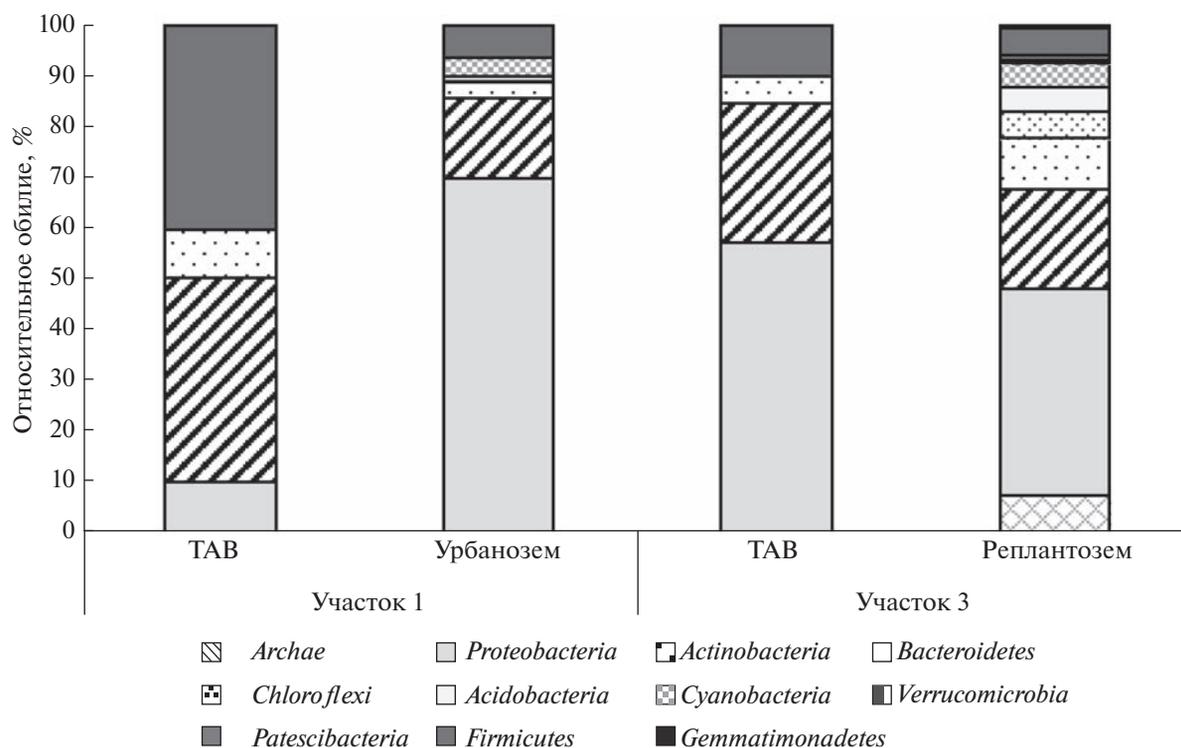


Рис. 1. Структура прокариотных сообществ пылеаэрозолей и урбаноземов участков 1 (Хамовники) и 3 (ТТК) *in situ*.

жали археям филума Thaumarchaeota и составляли 7% от общего числа прокариот в этом образце. Представители этого филума – нитрифицирующие археи, способные к окислению аммиака в анаэробных условиях и являющиеся хемолитотрофами [2, 39].

Во всех исследованных образцах пылеаэрозоля и почвы доминировали прокариоты филумов Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes, их доля в сообществах превышала 10%. Также обнаружены представители филумов Chloroflexi, Acidobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Patescibacteria и Gemmatimonadetes.

Обращает на себя внимание, что содержание отдельных филумов в пылеаэрозоле и городских почвах значительно различалось как по относительному содержанию отдельных филумов, так и

их числу. В пылеаэрозоле с участка 3 (ТТК) и городских почвах преобладающими являлись бактерии филума Proteobacteria (41–70%), меньше было содержание представителей филумов Actinobacteria (16–28%) и Bacteroidetes (3–10%). Больше филогенетическое разнообразие было характерно для образцов почв, меньшее – для пылеаэрозолей, что проявлялось как на уровне выявленных таксонов, так и для индексов биоразнообразия (табл. 4).

Минимальное филогенетическое разнообразие отмечено в образце пылеаэрозоля, отобранного на участке 1. Здесь выявлены только прокариоты, принадлежащие к трем филумам, причем доминировали Firmicutes и Actinobacteria (40%), известные своей устойчивостью к высушиванию, воздействию УФ-облучения и других факторов среды [4, 20].

Таблица 4. Индексы биоразнообразия прокариотных сообществ пылеаэрозолей и городских почв *in situ*

Участок	Образец	Индекс биоразнообразия		
		Чао	Шеннона	Симпсона
1, Хамовники	ТАВ	40.50	3.23	0.84
	Почва	95.60	5.31	0.97
3, ТТК	ТАВ	33.50	3.41	0.90
	Почва	88.60	5.82	0.98

Представители филума Proteobacteria являлись доминирующими в образцах урбанозема (участок 1, Хамовники) и пылеаэрозоля (участок 3, ТТК). Наибольшим было содержание представителей классов Alpha- и Gammaproteobacteria. Эти данные коррелируют с результатами, полученными при помощи метода посева, свидетельствующими о присутствии в пылеаэрозоле и городских почвах энтеробактерий, которые являются типичными представителями класса Gammaproteobacteria. Бактерии класса Alphaproteobacteria, обнаруженные в значительных количествах в исследованных образцах в основном принадлежали к порядкам Sphingomonadales, Rhizobiales, Caulobacteriales, Xanthomonadales (в городских почвах) и Sphingomonadales и Caulobacteriales (в пылеаэрозолях). Известно, что представители порядков Sphingomonadales, Rhizobiales и Xanthomonadales содержат значительное число видов бактерий, обычно выделяющихся из почвы и тесно связанных с высшими растениями [13, 15, 22, 24, 25].

Филум Bacteroidetes в основном был представлен порядками Chitinophagales, Cytophagales, Sphingobacteriales и Flavobacteriales. В образцах пылеаэрозоля доминировали бактерии, принадлежащие к порядку Flavobacteriales. В образце реплантозема (ТТК) выявлено наличие сравнительно недавно описанного и малоизученного филума Gemmatimonadetes. Ранее бактерии этого филума выделялись из почв прерий, лугов, а также эвтрофных озерных отложений и альпийских горных почв. Разнообразие сред, в которых были обнаружены прокариоты из данного филума, предполагает адаптацию бактерий к условиям низкой увлажненности [27], которая характерна для сухих периодов года в тропиках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые представлена комплексная (количественная и качественная) характеристика прокариотных сообществ твердых атмосферных выпадений (пылеаэрозоля) и городских почв (урбанозем и реплантозема) на территории г. Москвы на участках с разной интенсивностью антропогенной нагрузки.

Общая численность бактерий в исследованных образцах твердых атмосферных выпадений (ТАВ) была меньше численности бактерий в образцах городских почв; актиномицетный мицелий в образцах ТАВ не выявлен, хотя обнаружен в образцах почв, что позволяет предположить, что актиномицеты присутствуют в пылеаэрозоле в виде спор. Численность сапротрофных культивируемых бактерий в образцах ТАВ составляла миллионы колониеобразующих единиц на грамм и была на порядок меньше, чем в верхних горизонтах почв, отобранных на тех же участках. Среди культивируемых бактерий в пылеаэрозолях доминировали представители рода *Micrococcus*, в то

время как в почвах – представители филума Proteobacteria. В образцах твердых атмосферных выпадений обнаружены представители семейства Enterobacteriaceae (бактерии родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter*), среди которых имеются виды, потенциально патогенные для человека. Максимальное видовое разнообразие бактерий семейства Enterobacteriaceae зафиксировано в образцах ТАВ, отобранных на участках с повышенной транспортной нагрузкой и в центральных районах города. Санитарно-показательная бактерия *Escherichia coli* обнаружена во всех образцах ТАВ и почв на изученных участках, ее содержание варьировало от 10 до 100 КОЕ/г, что по оценке степени эпидемической опасности позволяет отнести эти почвы и пылеаэрозоли к классу умеренно опасных. Рассчитанные экологические показатели свидетельствуют о высоком разнообразии культивируемых бактерий в ТАВ и городских почвах на участках с повышенной антропогенной нагрузкой за счет обилия представителей семейства Enterobacteriaceae. На основании значений экологических индексов, рассчитанных для прокариотных сообществ *in situ* (баркодинг гена 16S рРНК), можно сделать вывод, что сообщества пылеаэрозолей характеризуется более низким таксономическим разнообразием по сравнению с сообществами близко расположенных урбаноземов и реплантозема. Очевидно, что на формирование прокариотных сообществ пылеаэрозолей оказывает значительное влияние индивидуальная устойчивость микроорганизмов к факторам среды, процессы пылепереноса, а также степень антропогенной нагрузки.

Проведенный филогенетический анализ пылеаэрозоля и почв на территории Хамовников и ТТК показал, что всех исследованных образцов доминировали представители филумов Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes. Содержание отдельных филумов в пылеаэрозоле и почвах значительно различалось, как по относительному содержанию отдельных филумов, так и их числу, в почвах в большей степени были представлены Proteobacteria, в ТАВ филум Actinobacteria, известный своей устойчивостью к воздействию УФ-лучей и высушиванию. Большое филогенетическое разнообразие характерно для образцов почв, меньшее – в образцах пылеаэрозоля, что проявлялось как на уровне выявленных таксонов, так и на уровне экологических индексов (индексы Чао и Шеннона).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта РФФИ № 19-05-50093 (“Микромир”) и в рамках программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А.* Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, ее объем, разнообразие и развитие // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. № 5–6. С. 38–48.
2. *Воробьева Л.И.* Археи: учебное пособие для вузов. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2007. 234 с.
3. *Глушакова А.М., Лысак Л.В., Умарова А.Б., Прокофьева Т.В., Подушин Ю.В., Быкова Г.С., Малокова Л.П.* Бактериальные комплексы урбаноземов некоторых южных городов России // Почвоведение. 2021. № 2. С. 224–231. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21020052>
4. *Добровольская Т.Г.* Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2002. 281 с.
5. *Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 60 с.
6. *Кожевин П.А.* Микробные популяции в природе. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. 175 с.
7. *Лысак Л.В.* Бактериальные сообщества городских почв. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2010.
8. *Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н.* Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС Пресс, 2003. 120 с.
9. *Лысак Л.В., Лапыгина Е.В.* Разнообразие бактериальных сообществ городских почв // Почвоведение. 2018. № 9. С. 1108–1114. <https://doi.org/10.1134/S0032180X18090071>
10. МР ФЦ/4022 Методы микробиологического контроля почвы.
11. МУ 2.1.7.730-99. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест.
12. *Мэгарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение М.: Мир, 1992. 184 с.
13. *Першина Е.В., Чернов Т.И.* Основные физико-химические параметры почв, определяющие структуру почвенного метабенома // Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики. 2017. С. 88–96.
14. *Ревич Б.А.* Климат, качество атмосферного воздуха и здоровье москвичей. М.: Адамант, 2006. 255 с.
15. *Тихонович И.А., Чернов Т.И., Железова А.Д., Тхакахова А.К., Андронов Е.Е., Кутювая О.В.* Таксономическая структура прокариотных сообществ почв разных биоклиматических зон // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2018. № 95. С. 125–153.
16. *Aminov R.I., Mackie R.I.* Evolution and ecology of antibiotic resistance genes // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 271. № 2. P. 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x>
17. *Arabaghian H., Salloum T., Alousi S., Panossian B., Araj G.F., Tokajian S.* Molecular characterization of carbenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* isolated from Lebanon // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36554-2>
18. *Araújo R., Vázquez Calderón F., Sánchez López J., Azevedo I.C., Bruhn A., Fluch S., Ullmann J.* Current status of the algae production industry in Europe: an emerging sector of the blue bioeconomy // Front. Mar. Sci. 2021. V. 7. P. 626389. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
19. *Belov A.A., Cheptsov V.S., Manucharova N.A., Ezhelev Z.S.* Bacterial communities of Novaya Zemlya archipelago ice and permafrost // Geosciences. 2020. V. 10 № 2. P. 67. <https://doi.org/10.3390/geosciences10020067>
20. *Belov A.A., Cheptsov V.S., Vorobyova E.A., Manucharova N.A., Ezhelev Z.S.* Stress-tolerance and taxonomy of culturable bacterial communities isolated from a central Mojave Desert soil sample // Geosciences. 2019. V. 9 № 4. P. 166. <https://doi.org/10.3390/geosciences9040166>
21. *Bergey D.H.* Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology. Springer Science & Business Media, 2001.
22. *Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P.C., Weiman A., Dröge J., Pan Y., Schulze-Lefert P.* Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley // Cell Host Microbe. 2015. V. 17 № 3. P. 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
23. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Knight R.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 5. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
24. *Chaparro J.M., Badri D., Vivanco J.M.* Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development // The ISME J. 2014. V. 8. № 4. P. 790–803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>
25. *Daniel R.* The metagenomics of soil // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 470–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>
26. *Davin-Regli A., Pagès J.M.* Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
27. *de Bruyn J., Nixon L., Fawaz M., Johnson M., Radosevich M.* Global Biogeography and Quantitative Season Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 17. P. 6295–6300. <https://doi.org/10.1128/AEM.05005-11>
28. *Després V.R., Huffman J.A., Burrows S. M., Hoose C., Safatov A., Buryak G., Jaenicke R.* Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review // Tellus B: Chem. Phys. Meteorol. 2012. V. 64. № 1. P. 15598. <https://doi.org/10.3402/tellusb.v64i0.15598>
29. *Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Prokofeva T.V., Lysak L.V.* Enterobacteriaceae in soils and atmospheric dust aerosol accumulations of Moscow city // Current Res. Microbiol. Sci. 2022. V. 3. P. 100124. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100124>
30. *Goel A., Kumar P.* Characterisation of nanoparticle emissions and exposure at traffic intersections through fast-response mobile and sequential measurements //

- Atmos. Environ. 2015. V. 107. P. 374–390.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.02.002>
31. Karagulian F., Belis C.A., Dora C.F.C., Prüss-Ustün A.M., Bonjour S., Adair-Rohani H., Amann M. Contributions to cities' ambient particulate matter (PM): A systematic review of local source contributions at global level // Atmos. Environ. 2015. V. 120. P. 475–483.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.08.087>
 32. Kumari S., Jain M.K. A critical review on air quality index // Environ. Pollut. 2018. P. 87–102.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-5792-2_8
 33. Luong L.M., Phung D., Sly P.D., Morawska L., Thai P.K. The association between particulate air pollution and respiratory admissions among young children in Hanoi, Vietnam // Sci. Total Environ. 2017. V. 578. P. 249–255.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.012>
 34. Phan C.C., Nguyen T.Q.H., Nguyen M.K., Park K.H., Bae G.N., Seung-bok L., Bach Q. Aerosol mass and major composition characterization of ambient air in Ho Chi Minh City, Vietnam // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2020. V. 17. № 6. P. 3189–3198.
<https://doi.org/10.1007/s13762-020-02640-0>
 35. Prokof'eva T.V., Shoba S.A., Lysak L.V., Ivanova A.E., Glushakova A.M., Shishkov V.A., Lapygina E.V., Shilaitka P.D., Glebova A.A. Organic constituents and biota in the urban atmospheric solid aerosol: potential effects on urban soils // Eurasian Soil Sci. 2021. 54. №. 10. P. 1532–1545.
<https://doi.org/10.1134/S1064229321100094>
 36. Prokof'eva T.V., Kiryushin A.V., Shishkov V.A., Ivannikov E.A. The importance of dust material in urban soil formation: the experience on study of two young Technosols on dust depositions // J. Soils Sediments. 2017. V. 17. № 2. P. 515–524.
<https://doi.org/10.1007/s11368-016-1546-7>
 37. Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner, F.O. SILVA: a comprehensive on-line resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. № 21. P. 7188–7196.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
 38. Stokes H.W., Gillings M.R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens // FEMS Microbiol. Rev. 2011. V. 35. № 5. P. 790–819.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>
 39. Tourna M., Stieglmeier M., Spang A., Könneke M., Schintlmeister A., Urich T., Schleper C. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 20. P. 8420–8425.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1013488108>
 40. Vlasov D., Kosheleva N., Kasimov N. Spatial distribution and sources of potentially toxic elements in road dust and its PM10 fraction of Moscow megacity // Sci. Total Environ. 2021. V. 761. P. 143267.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143267>
 41. World Health Organization. Air quality guidelines for Europe. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2000.

Abundance and Diversity of Prokaryotic Communities of Dust Aerosol and Urban Soils on the Territory of Moscow

L. V. Lysak^{1, *}, S. A. Shoba¹, T. V. Prokof'eva¹,
 A. M. Glushakova^{1,2}, N. V. Goncharov¹, and A. A. Belov¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

*e-mail: lvlysak@mail.ru

The complex (quantitative and qualitative) characteristics of prokaryotic communities of solid atmospheric fallouts (dust aerosol) and soils in the territory of Moscow in areas with different intensity of anthropogenic load have been done. The total number of bacteria in the studied samples of solid atmospheric fallouts (SAF) was lower than the number of bacteria in soil samples; actinomycete mycelium was not found in the dust samples, although it was found in soil samples. The number of culturable saprotrophic bacteria in dust samples was an order of magnitude lower than in Urbic Technosols taken from the same plots. Representatives of the genus *Micrococcus* dominated among cultivated bacteria in the dust aerosols, while representatives of the phylum Proteobacteria dominated in soils. Representatives of the Enterobacteriaceae family were found in the dust samples, among which there are species that are potential human pathogens. The maximum biodiversity of bacteria of the Enterobacteriaceae family was recorded in the dust samples taken in areas with increased anthropogenic and transport load. The sanitary-indicative bacterium *Escherichia coli* was found in all samples of the dust and Urbic Technosols, its content varied (from 10 to 100 CFU/g), according to the degree of epidemic danger it characterizes dust and soils as moderately dangerous. Ecological indices calculated for prokaryotic communities in situ (barcoding of the 16S rRNA gene) indicate a lower taxonomic diversity of SAF prokaryotic communities compared to communities of closely spaced Urbic Technosols.

Keywords: Urbic Technosols, bacterial abundance, DNA metabarcoding, soil sanitary condition, ecological functions of soils, atmospheric solids

ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

УДК 631.46:631.48:930.26

КОЭФФИЦИЕНТЫ ПЕРЕСЧЕТА СОДЕРЖАНИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК В УГЛЕРОД МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ

© 2023 г. Е. В. Чернышева^а, *, Ф. Форназьер^б, А. В. Борисов^а

^аИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
ул. Институтская, 2а, Пушкино, 142290 Россия

^бSoliomics, Via дель Котонифичо, 129/В, Удине, 33100 Италия

*e-mail: e.chernyusheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.10.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Проведено исследование взаимосвязи концентрации почвенной ДНК и микробной биомассы, определенной методом субстрат-индуцированного дыхания, в широком ряду почв, различающихся по гранулометрическому составу, кислотности, содержанию органического углерода, микробной биомассе, различных по характеру хозяйственного использования в древности и в настоящее время. В качестве объектов исследования выбраны темногумусовые почвы сельскохозяйственных угодий на Центральном Кавказе, стратоземы сельскохозяйственных террас позднего средневековья – нового времени в среднегорной зоне Восточного Кавказа, каштановые почвы и солонцы на участках с различной интенсивностью выпаса в сухостепной зоне (Ростовская область). Показано, что определение концентрации почвенной двухцепочечной ДНК является надежным и простым методом исследования микробной биомассы в почвах со средне-, тяжелосуглинистым гранулометрическим составом, содержанием органического углерода не более 2%, микробной биомассы не более 700 мкг С/г сухой почвы. Пересчетный коэффициент $F_{\text{ДНК}}$ в таких почвах варьировал в узком диапазоне от 5.24 до 5.41. В почвах с высоким содержанием органического углерода наблюдалось завышение $F_{\text{ДНК}}$ (6.56 и 10.56) из-за присутствия устойчивой к разложению внеклеточной ДНК. Почва легкого гранулометрического состава на песчаниках характеризовалась меньшей степенью сохранности ДНК, что привело к уменьшению определяемой микробной биомассы ($F_{\text{ДНК}} = 4.22$). Пониженный коэффициент пересчета $F_{\text{ДНК}}$ (4.78) выявлен в почвах естественных пастбищ в сухостепной зоне, что подтверждает известные ограничения возможности использования метода субстрат-индуцированного дыхания в щелочных почвах. Хозяйственная деятельность не оказывает значимого влияния на взаимосвязь количества почвенной ДНК и микробной биомассы.

Ключевые слова: субстрат-индуцированное дыхание, почвенная ДНК, выпас, распашка, почвообразующие породы, древнее и современное хозяйственное использование

DOI: 10.31857/S0032180X2260127X, EDN: IEOYRG

ВВЕДЕНИЕ

Определение микробной двухцепочечной ДНК (**дцДНК**) является альтернативным методом исследования почвенной микробной биомассы при наличии условий, ограничивающих применение других методов. В отличие от методов, основанных на определении не прямых показателей, ДНК-метод позволяет оценивать микробную биомассу, измеряя непосредственное количество базового клеточного компонента, универсального для всех живых организмов [33].

Одним из традиционных методов определения микробной биомассы в почвах является метод субстрат-индуцированного дыхания (**СИД**) [6]. Его преимущества – высокая воспроизводимость, чувствительность, относительно невысо-

кие время- и трудозатратность. Метод лишен некоторых недостатков других способов определения микробной биомассы в почвах. Например, для методов прямой микроскопии таковыми являются высокая субъективность исследователя, для метода фумигации–экстракции – высокая трудозатратность, существенное влияние растительных остатков [29] и потенциальные риски для здоровья человека в случае выброса паров хлороформа. Метод СИД имеет существенные ограничения: не применим для почв с сильноокислой ($\text{pH} < 2.5$) и сильнощелочной реакцией среды ($\text{pH} > 8.5$) [9]. Поэтому необходимо привлечение новых молекулярно-генетических методов для оценки микробной биомассы в почвах, различающихся по физико-химическим свойствам, и лишенных недостатков традиционных методов.

При исследовании широкого ряда почв показано, что суммарный вклад растений, бактерий и грибов не превышал 50% от всей выделенной дцДНК, доля растительной дцДНК составила 2.6%, на бактериальную и грибную дцДНК приходилось 22.2 и 46.5% соответственно [16]. Определение концентрации дцДНК в почве может быть надежным методом исследования именно микробной биомассы в почве.

Во многих исследованиях показана тесная взаимосвязь количества почвенной ДНК и микробной биомассы [7, 10, 25, 33], но в ряде работ выявлено отсутствие взаимосвязи [19, 24, 27], что связано со следующими ограничениями:

– *отсутствие единого подхода к выделению дцДНК*. Различные коммерческие наборы для выделения почвенной ДНК обладают различной эффективностью экстракции [18];

– *различия эффективности экстракции ДНК в зависимости от почвенных характеристик*. На количество определяемой ДНК может существенно влиять присутствие гуминовых веществ [8], почвенная структура, гранулометрический состав [24] и степень фрагментация дцДНК [17];

– *присутствие в образце растительных остатков и внеклеточной ДНК*. Внеклеточная ДНК может закрепляться на почвенных минералах и становится недоступной для микробного разложения [28]. Кроме того, некоторое количество ДНК выделяется растениями и сохраняется в почве в течение нескольких месяцев [35];

– *структура микробного сообщества*. Почвы, различающиеся физико-химическими свойствами, могут обладать различной структурой микробного сообщества, что оказывает влияние на содержание ДНК в пересчете на единицу углерода микробной биомассы. Например, грибное сообщество вносит меньший вклад генетического материала в почвенный пул ДНК по сравнению с бактериальным [18].

Как правило, в исследованиях пересчетный коэффициент ($F_{\text{ДНК}}$) дцДНК в углерод микробной биомассы, определенный методом СИД ($C_{\text{мик}}$ –СИД), варьирует в узком диапазоне от 5 до 6 [7, 10, 25, 33]. Значения $F_{\text{ДНК}} \approx 6$ указывает, что 13% углерода микробной биомассы составляет ДНК [21]. Однако есть исследование [18], в котором величина пересчетного коэффициента значительно больше и составляет 38.11, но при его применении удалось получить микробную биомассу, близкую к величинам микробной биомассы, определенной методом фунигации–экстракции. В настоящей работе использовали протокол NanoDgor™ для определения ДНК в почве, в отличие от вышеупомянутых исследований, где применяли PicoGreen®, что могло вызвать различия в величине пересчетного коэффициента.

Следует отметить, что в вышеуказанных работах не приведены результаты исследования большого числа почв из разных природных зон и не приводятся данные для почв антропогенно-нарушенных и ненарушенных экосистем, что может ограничивать точность пересчетного коэффициента концентрации ДНК в микробную биомассу. В недавней работе Х. Гонг с соавт. [18] эта проблема рассмотрена наиболее глубоко и комплексно, проведено исследование 124 образцов почв из различных экосистем: пустыня, типичная степь, степной луг, лес и пашня.

Цель настоящей работы – установить взаимосвязь между концентрацией почвенной дцДНК и углеродом микробной биомассы в широком ряду почв, различающихся не только по физико-химическим свойствам, но и временем (древняя, современная) и формам (распашка, выпас) антропогенной нагрузки. Предполагали, что величина пересчетного коэффициента определяется почвенными свойствами: гранулометрическим составом, содержанием органического углерода, рН, временем и характером хозяйственного освоения территории. Исходили из предположения, что антропогенная нагрузка в древности и в настоящее время вызывает нарушение корреляции между содержанием почвенной дцДНК и микробной биомассой. В связи с этим регрессионный анализ проводили отдельно для каждой группы объектов.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Почвы земледельческих угодий. В качестве объектов исследования выбраны почвы потенциальной земледельческой периферии поселения аланской культуры Подкумское-3 (V–VIII вв. н.э., Карачаево-Черкесская Республика). Объекты исследования располагались на северных отрогах Пастбищного хребта. Климат региона умеренно континентальный. Количество осадков составляет около 600 мм, среднегодовая температура около +8°C. Сумма температур >10°C составляет 2400–2600°C [2]. Почвенный покров представлен карболитоземами темногумусовыми (Calcaric Leptosols) и темногумусовыми почвами (Leptic Phaeozems). Почвообразующими породами служат карбонатные продукты выветривания древних осадочных пород: известняки, доломиты, мергели, перекрытые глинами и суглинками. Растительный покров представлен разнотравной луговой растительностью. Абсолютные высоты 1200–1400 м. В эпоху средневековья территория распахивалась и удобрялась навозом, после чего находилась в залежном состоянии до настоящего времени [13]. В пределах потенциальной сельскохозяйственной зоны поселения Подкумское-3 заложили серию почвенных разрезов по единой катене, ориентированной в направлении водораздел–мыс на

удалении 60, 120, 250, 600, 1200 и 2300 м от поселения. Разрезы закладывали в зоне регулярной распашки с внесением навоза, в зоне распашки без внесения навоза и на фоновой территории без внесения навоза и распашки. Результаты морфологического, химического и биологического исследований представлены ранее [13].

Вторым объектом изучения стали **почвы земледельческих террас** в среднегорной зоне Восточного Кавказа (Республика Дагестан). Террасы, предположительно, созданы в эпоху развитого Средневековья и функционировали до 80–90 гг. прошлого столетия. Исследовали антропогенные почвы земледельческих террас, сформированных на разных породах:

– стратозем темногумусовый (Plaggic Anthrosol) ключевого участка Гуниб (3 км к западу от с. Гуниб, абсолютная высота 1690 м) сформирован на смешанном делювий глин, аргиллитов и песчаников с включениями известняков нижнего мела; почвы террас находятся в залежном состоянии более 150 лет;

– стратозем темногумусовый (Plaggic Anthrosol) ключевого участка Акуша (2.5 км к северо-западу с. Акуша, абсолютная высота 1440 м) сформирован на элювий песчаников с включениями аргиллитов; находится в залежном состоянии не более 10–20 лет;

– стратозем темногумусовый (Hortic Anthrosol) ключевого участка Муги (1.5 км к западу от с. Муги, абсолютная высота 1530 м) развит на известняках верхней юры–нижнего мела; почва находится в залежном состоянии более 50 лет;

– стратозем темногумусовый (Plaggic Anthrosol) ключевого участка Джаба (3.5 км к юго-востоку от с. Джаба, абсолютная высота 1960 м) сформирован на глинистых сланцах и аргиллитах средней юры; почва находится в залежном состоянии более 50 лет.

Подробное описание морфологических и химических свойств данных объектов представлено ранее [3].

Почвы пастбищ. Объекты исследования расположены в Донской провинции каштановых почв в пределах Сальско-Маньчской гряды, Ростовская область. Климат региона умеренно континентальный. Среднегодовое количество осадков составляет около 350 мм [1]. Сумма температур воздуха $>10^{\circ}\text{C}$ равна 2900–3100 $^{\circ}\text{C}$. Среднегодовая температура $+6^{\circ}\text{C}$. Почвообразующие породы преимущественно представлены лёссовидными суглинками и опесчаненными отложениями Ергенинской свиты. Наиболее характерными для данной территории являются каштановые и светло-каштановые солонцеватые почвы в комплексе с солонцами [4]. Растительный покров неоднородный: на солонцовых пятнах развита, в основном, полукустарничковая (попынная) раститель-

ность, ареалы каштановых почв заняты злаковой растительностью. Оценку микробной биомассы почв проводили в условиях интенсивного, умеренного и эпизодического выпаса. Подробное описание ключевого участка и результатов морфологического и химического анализа представлено ранее [22].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наиболее репрезентативные участки выбирали по результатам низковысотной съемки с квадрокоптера. На данных участках выполняли морфолого-генетическое описание профилей почв. Образцы для химических и микробиологических анализов отбирали по генетическим горизонтам и послойно через 10 см в случае недифференцированного профиля. Образцы для микробиологических анализов отбирали с соблюдением условий стерильности.

Содержание органического углерода определяли в воздушно-сухой почве методом мокрого сжигания по Тюрину, рН водной вытяжки – потенциометрическим методом, содержание карбонатов – ацидиметрическим методом, гранулометрический состав – пипеточным методом¹ [5]. Физические и химические свойства исследовали в воздушно-сухой почве.

Почвенную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора FastDNA® SPIN kit for Soil (MP Biomedicals, Германия). Для экстракции использовали навеску нативной почвы 0.3 г и 1.25 мл натрий-фосфатного буфера (0.12 М, рН 7.8) вместе с керамическими и стеклянными шариками. Далее почвенную суспензию гомогенизировали с помощью гомогенизатора FastPrep® (Thermo Savant, США). Затем почвенные вытяжки центрифугировали, дцДНК в супернатанте измеряли флуориметрически с использованием красителя пикограмма (Life Technologies, США) на микропланшетном ридере FLUOstar omega (BMG Labtech, Германия). Пикограмм селективно связывается с дцДНК, увеличивая интенсивность флуоресценции в 1000 раз, пропорционально концентрации ДНК [33]. Высокая селективность пикограмма позволяет использовать его для количественного определения тотальной почвенной дцДНК даже в присутствии примесей гуминовых веществ и остатков клеточных стенок [8]. Полученные результаты выражали в мкг дцДНК/г сухой почвы [15]. Для определения концентрации дцДНК образцы хранили при -20°C , перед исследованием почву размораживали и предынкубировали при 22°C в течение 2 сут. Микробную биомассу ($C_{\text{мик}}-\text{ДНК}$) рассчитывали путем умножения пересчетного коэффициента

¹ Химические анализы выполняли в ЦКП ИФХиБПП РАН.

($F_{\text{ДНК}}$) на концентрацию дцДНК в образце. Полученные $F_{\text{ДНК}}$ для каждой группы объектов будут описаны ниже. Кроме того, для расчета $C_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ использовали средний коэффициент $F_{\text{ДНК}} = 6$.

Микробную биомассу ($C_{\text{мик}}-\text{СИД}$) рассчитывали по скорости СИД после обогащения почвы глюкозой с использованием коэффициента пересчета 40.04 [6]. Для определения микробной биомассы почву предварительно инкубировали при 22°C и влажности 60% полной влагоемкости в течение 7 сут. Всего исследован 121 образец.

Полученные результаты выражали на абсолютно сухую навеску почвы. Показаны средние значения из трех повторностей \pm ошибка среднего. Для оценки взаимосвязи средней концентрации дцДНК и средней микробной биомассы проводили регрессионный анализ методом робастной регрессии, позволяющим снизить влияние «выбросов» в выборке при построении модели, благодаря чему в некоторых случаях он является предпочтительнее метода наименьших квадратов [12]. Статистическую обработку данных проводили в программе Past 4.03.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химические и физические свойства почв. Исследованные почвы существенно различались по химическим и физическим свойствам (табл. S1). Гранулометрический состав почв древних полей в окрестностях поселения Подкумское-3 имел тенденцию к сокращению доли крупных фракций по мере удаления от памятника. Наиболее легким гранулометрическим составом характеризовалась ближайшая к поселению почва, в зоне регулярного внесения навоза в средневековье.

Гранулометрический состав почв сельскохозяйственных террас Горного Дагестана различался существенно. Наиболее тяжелый гранулометрический состав отмечен у почв ключевых участков Муги и Джаба, сформированных на известняках и глинистых сланцах соответственно, наиболее легкий — у почв ключевого участка Акуша, сформированных на песчаниках. Почвы естественных пастбищ сухостепной зоны характеризовались среднесуглинистым гранулометрическим составом в верхних горизонтах, который сменялся на тяжелосуглинистый в иллювиальных. В солонцах текстурная дифференциация верхней части профиля выражена наиболее резко.

Содержание органического углерода в исследованных почвах существенно различалось. Наибольшее количество $C_{\text{орг}}$ выявлено в почвах средневековых полей в окрестностях поселения Подкумское-3, где оно варьировало от 3.6 до 8.8% в горизонте АU, и от 0.9 до 3.9% в срединных горизонтах. Высокое содержание органического углерода в почвах бывших сельскохозяйственных уго-

дий связано с внесением органических удобрений в период возделывания [20] и длительностью пребывания в залежном состоянии.

Среди агростратифицированных почв сельскохозяйственных террас наибольшее содержание $C_{\text{орг}}$ выявлено в профиле почвы, сформированной на известняках (ключевой участок Муги). В почвах террас, сформированных на других почвообразующих породах, содержание органического углерода было существенно меньше, хотя, судя по обилию керамики, углей и бытового мусора в почвах, можно предполагать, что в древности эти террасы удобрялись. Возможно, в данном случае почвообразующая порода выступала в качестве предиктора, влияющего на стабилизацию почвенного органического углерода [34], что связано с содержанием карбонатов, так как Ca^{2+} может влиять на накопление органического вещества за счет уменьшения скорости его минерализации [30, 31].

Минимальное содержание $C_{\text{орг}}$ выявлено в почвах выпаса сухостепной зоны, где оно варьировало от 0.3 до 1.7%.

Все исследованные почвы характеризовались нейтральной или щелочной реакцией среды. Древние пахотные почвы в окрестностях аланского поселения Подкумское-3 отличались заметным варьированием значений pH от 6.1 на наиболее удаленных от поселения участках до 7.9 в зоне древней распашки, непосредственно прилегающей к памятнику. В почвах сельскохозяйственных террас слабощелочная реакция среды (pH 7.5–8.0) в верхних горизонтах сменялась на средне- и сильнощелочную (8.1–8.6) в нижней части профиля. Близкие к нейтральным значения pH были в почве на делювии глин, аргиллитов и песчаников (ключевой участок Гуниб); наиболее щелочная реакция отмечена в почве ключевого участка Джаба, сформированной на глинистых сланцах. Среди всех исследованных почв максимальные значения pH выявлены в почвах естественных пастбищ сухостепной зоны. Здесь на участках с наиболее интенсивным выпасом значения pH достигали 9.4.

Все изученные почвы характеризовались высоким содержанием карбонатов, однако только в случае с пастбищными почвами сухостепной зоны и террасовой почвой на песчаниках они имели педогенную природу. В почвах предгорной и среднегорной зоны карбонаты имели литогенную природу и не оказывали существенного влияния на реакцию среды этих почв.

Взаимосвязь микробной биомассы и концентрации почвенной ДНК. Микробная биомасса, определенная методом СИД, варьировала в пределах от 8.9 до 1440 мкг С/г сухой почвы. Максимальные значения наблюдались в почвах в зоне регулярного внесения навоза в окрестностях поселе-

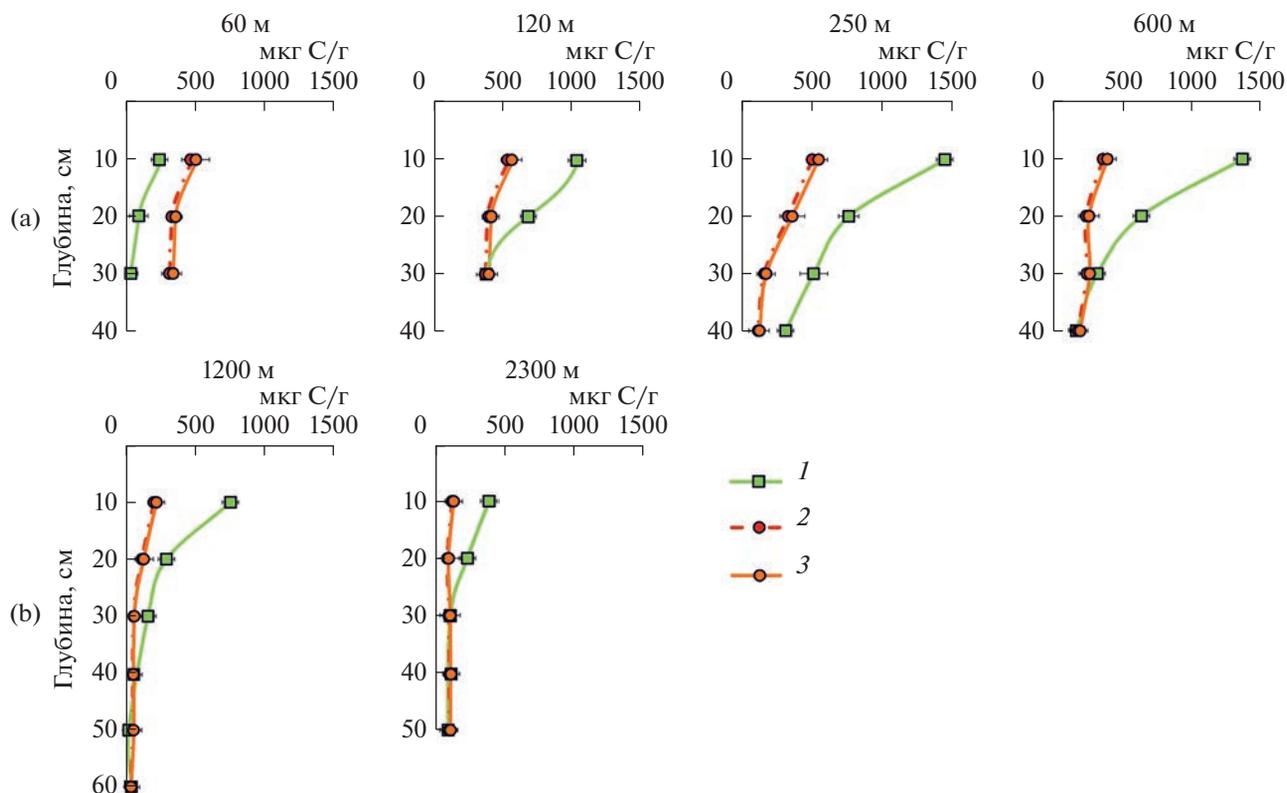


Рис. 1. Распределение микробной биомассы в почвах ключевого участка Подкумское-3: а – зона с регулярным внесением навоза в средневековье; б – зона без внесения навоза. 1 – $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$; 2 – $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$, определенная по литературному $F_{\text{ДНК}} = 6$; 3 – $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$, определенная с использованием $F_{\text{ДНК}}$, полученным в настоящей работе.

ния Подкумское-3 (рис. 1). В почвах террас микробная биомасса в верхних слоях составляла 428–511 мкг С/г сухой почвы и определялась даже в глубинных слоях при высоких значениях рН (рис. 2).

В почвах пастбищ сухостепной зоны микробная биомасса достигала 690 мкг С/г сухой почвы (рис. 3), при этом отмечена взаимосвязь этого показателя с интенсивностью пастбищной нагрузки. В частности, максимальные значения выявлены в зонах умеренного и эпизодического выпаса, минимальные – в зоне сильного выпаса. При исследовании сильнощелочных почв полупустынной зоны $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ не определялась в глубоких слоях в связи с поглощением CO_2 из воздуха почвенными карбонатами [33]. В настоящем исследовании в сильнощелочных горизонтах почв занижение микробной биомассы, по-видимому, было незначительным. Однако, если в сильнощелочных почвах земледельческих террас Дагестана наблюдалось равномерное уменьшение $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ с глубиной, то в почвах сухостепной зоны, в некоторых случаях, отмечен дополнительный выброс CO_2 на глубине 30–50 см, что привело к завышению значений микробной биомассы на этой глубине, где значения $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ больше, чем в верхних горизонтах.

Масштабы варьирования концентрации дцДНК в различных горизонтах изученных почв были весьма значительными и изменялись более, чем на два порядка: от 0.8 до 87.1 мкг/г сухой почвы. При этом закономерности распределения дцДНК, как между ключевыми участками, так и в пределах отдельного почвенного профиля аналогичны таковым для микробной биомассы. Данные характеризуются положительной линейной связью со следующими коэффициентами ранговой корреляции Спирмана: для почв естественных пастбищ сухостепной зоны $R^2 = 0.90$; для древних унавоживаемых почв $R^2 = 0.82$. Для почв земледельческих террас сила корреляционной связи между содержанием дцДНК и микробной биомассой во многом определялась литологическими условиями: в почвах на известняках и делювии глин, аргиллитов и песчаников (ключевые участки Мути и Гуниб соответственно) этот показатель составлял $R^2 = 0.99$; в почве на глинистых сланцах (Джаба) он был несколько меньше, $R^2 = 0.93$; и наименьшее значение выявлено для почв на песчаниках (ключевой участок Акуша) – $R^2 = 0.90$.

Для установления взаимосвязи между $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ и концентрацией дцДНК в выборку для регрессионного анализа не включали почвенные слои с

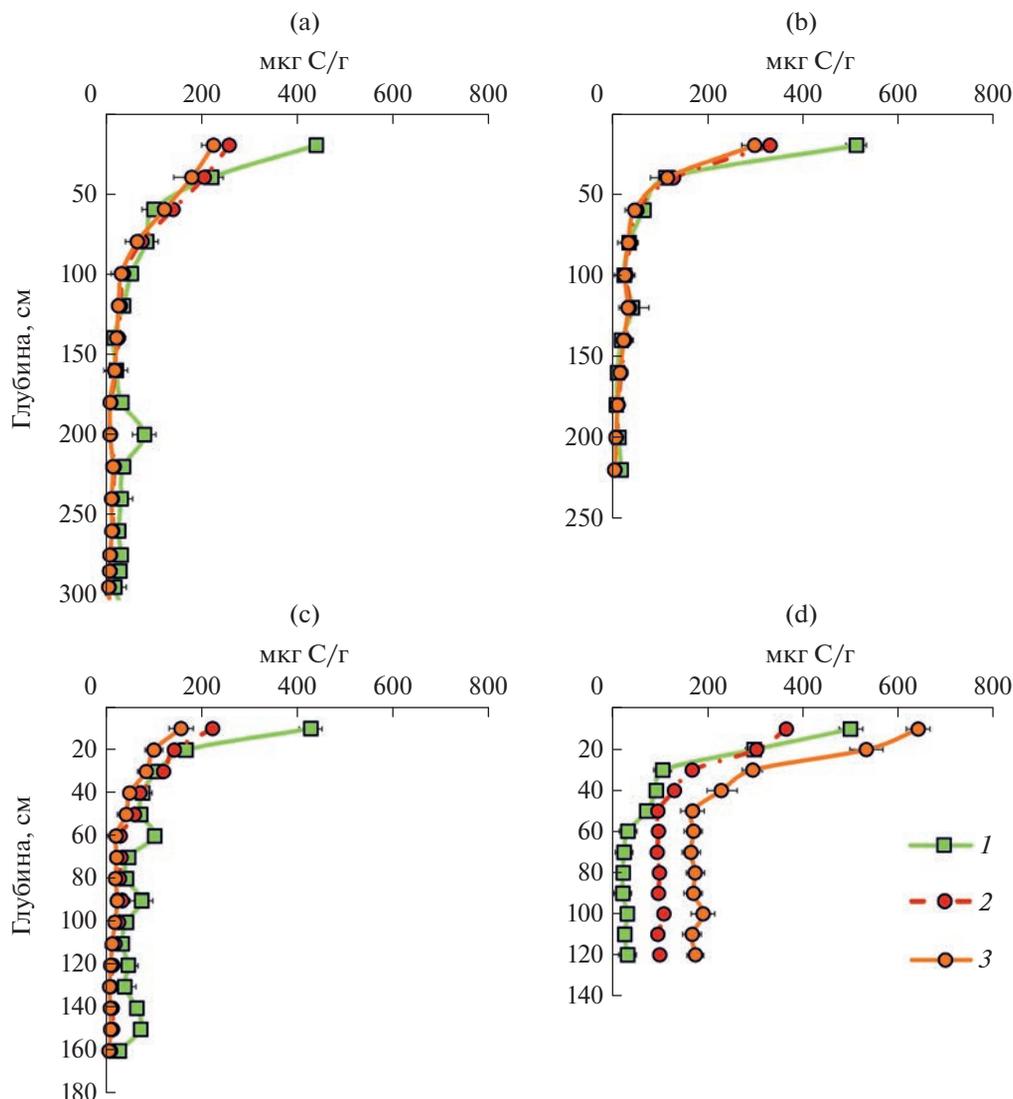


Рис. 2. Распределение микробной биомассы в агростратифицированных почвах сельскохозяйственных террас: а – ключевой участок Джаба; б – ключевой участок Гуниб; с – ключевой участок Акуша; д – ключевой участок Муги. 1 – $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$; 2 – $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$, определенная по литературному $F_{\text{ДНК}} = 6$; 3 – $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$, определенная с использованием $F_{\text{ДНК}}$, полученным в настоящей работе.

микробной биомассой >1000 мкг С/г почвы, так как определяемые значения ДНК могут оказаться ниже при очень высоких значениях микробной биомассы [7]. Не были включены слои почв, в которых наблюдалось завышение микробной биомассы, определяемой методом СИД, предположительно вызванное вкладом абиогенного CO_2 почвенных карбонатов.

Из уравнения регрессии получен пересчетный коэффициент $F_{\text{ДНК}}$, равный 5.7 ($n = 104$), что близко к коэффициентам пересчета, используемым другими исследователями, однако коэффициент детерминации был невысоким ($R^2 = 0.69$). В связи с этим в дальнейшем регрессионный анализ проводили отдельно для каждой группы объектов.

Тесная достоверная корреляция характерна для почв сельскохозяйственных террас Горного Дагестана (рис. 4а–4д). Из уравнений регрессии получены следующие коэффициенты пересчета для почв, сформированных на разных почвообразующих породах:

- на известняках – $F_{\text{ДНК}} = 10.56$ ($R^2 = 0.96$);
- на делювии глин, аргиллитов и песчаников – $F_{\text{ДНК}} = 5.41$ ($R^2 = 0.98$);
- на глинистых сланцах – $F_{\text{ДНК}} = 5.24$ ($R^2 = 0.82$);
- на песчаниках – $F_{\text{ДНК}} = 4.22$ ($R^2 = 0.81$).

С использованием этих коэффициентов рассчитана микробная биомасса $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$. В результате пересчета получились практически

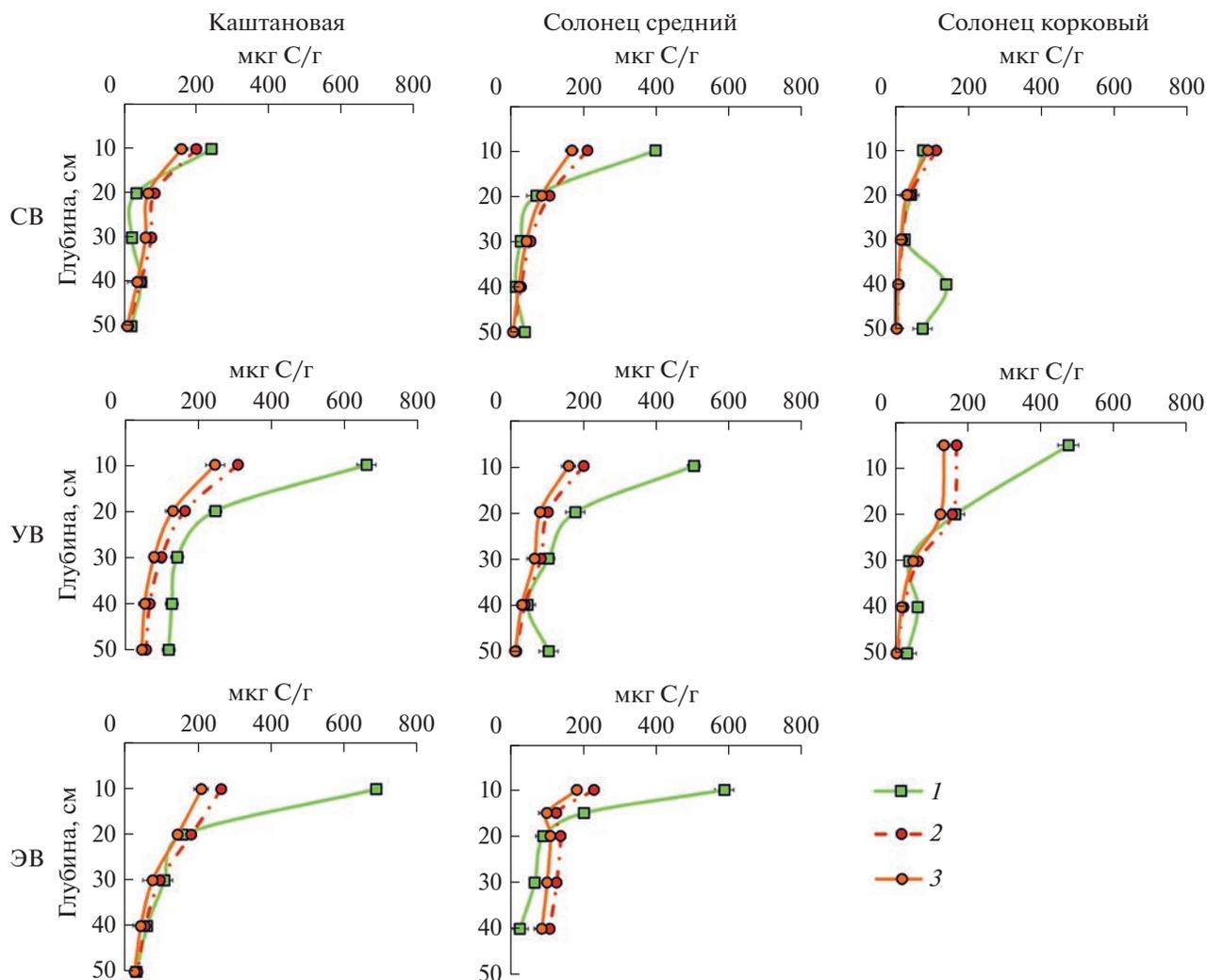


Рис. 3. Распределение микробной биомассы в почвах выпаса. СВ – сильный выпас; УВ – умеренный выпас; ЭВ – эпизодический выпас. 1 – $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$; 2 – $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$, определенная по литературному $F_{\text{ДНК}} = 6$; 3 – $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$, определенная с использованием $F_{\text{ДНК}}$, полученным в настоящей работе.

идентичные значения $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$ и $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ в почвах ключевых участков Гуниб (делювий глин) и Джаба (сланцы), за исключением верхнего слоя 0–20 см, где $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$ в 2 раза меньше, чем $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$, что может указывать на неполноту выделения дцДНК из-за недостаточного лизиса микробных клеток и сорбции коллоидными частицами [27].

В почве террасы на известняках $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ в 1.3–2.8 раз меньше $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$ в почвенной толще до глубины 50 см, а в нижележащей толще в 5.2–8.1 раз. Повышение концентрации ДНК в этой почве могло произойти за счет устойчивой внеклеточной ДНК, источником которой являются растительные остатки и мертвые микробные клетки [24]. Сохранению внеклеточной ДНК способствовал тяжелый гранулометрический состав, насыщенность почвы основаниями и высо-

кое содержание органического углерода по всему профилю. Известно, что гуминовые вещества способны связывать внеклеточную ДНК с помощью катионной связи [14].

Обратная ситуация отмечена в террасовой почве на песчаниках. Здесь по всему профилю наблюдали существенно меньшие значения микробной биомассы, определенной методом измерения дцДНК, особенно в нижних горизонтах. Так, значения $S_{\text{мик}}\text{-СИД}$ вниз по профилю уменьшались от 430 до 28 мкг С/г сухой почвы, а значения $S_{\text{мик}}\text{-ДНК}$ – от 157 до 7 мкг С/г почвы. Причиной может быть меньшая степень сохранности дцДНК и ее большая фрагментация в данной почве [17], что связано с более легким гранулометрическим составом. Установлено, что способность песка связывать ДНК на три порядка меньше, чем у глины [11, 26, 32].

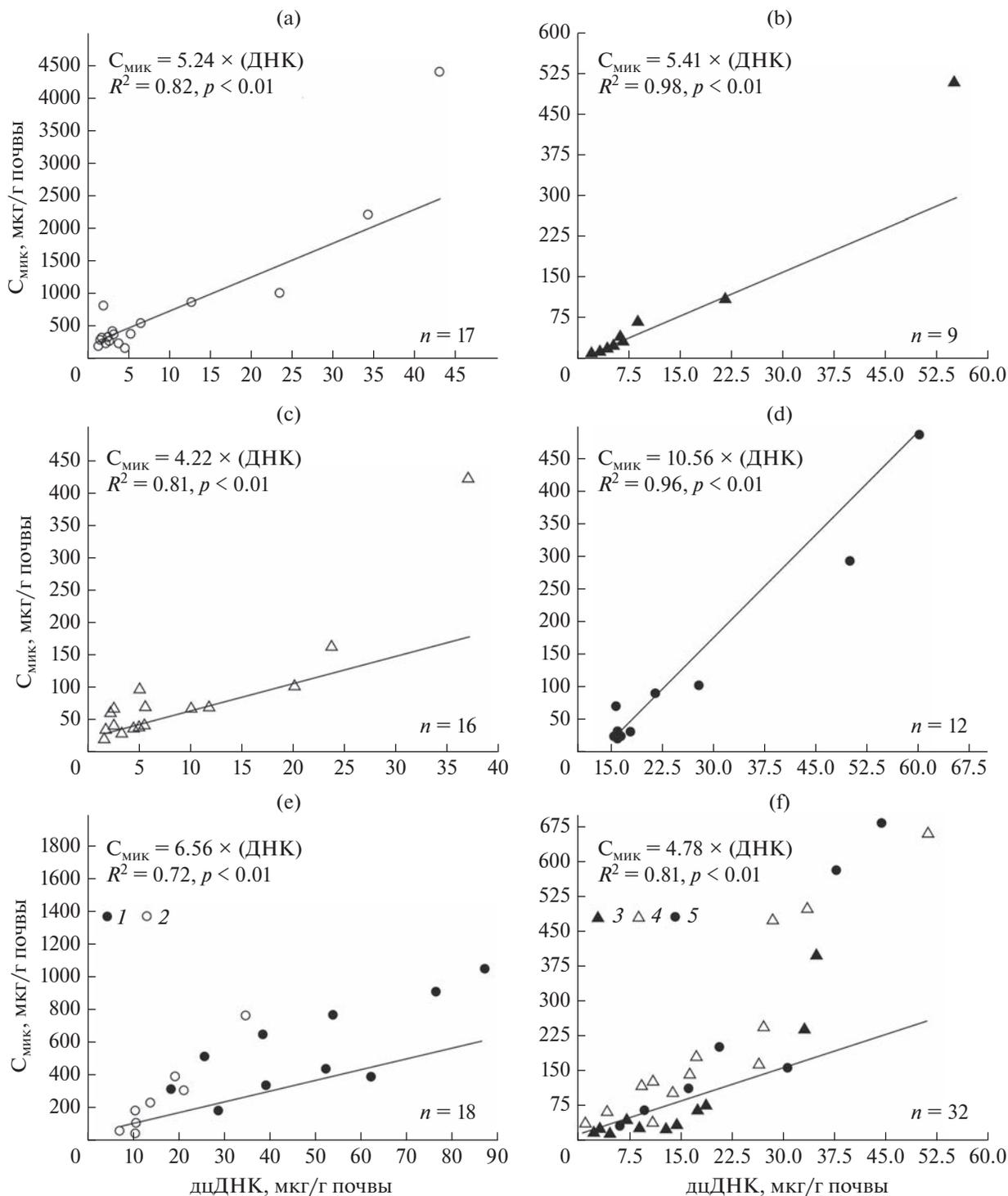


Рис. 4. Регрессия между концентрацией дцДНК и $C_{\text{мик}}$ –СИД в почвах ключевых участков: а – ключевой участок Джаба; б – ключевой участок Гуниб; с – ключевой участок Акуша; д – ключевой участок Муги; е – ключевой участок Подкумское-3; ф – почвы выпаса. 1 – зона регулярного внесения навоза в средневековье; 2 – зона без внесения навоза; 3 – сильный выпас; 4 – умеренный выпас; 5 – эпизодический выпас.

В почвах окрестностей средневекового поселения Подкумское-3 корреляционная связь между концентрацией дцДНК и микробной биомассой существенно меньше (рис. 4е), полученный

коэффициент $F_{\text{ДНК}} = 6.56$ ($R^2 = 0.72$). В почвах в зоне регулярного внесения навоза (на удалении 120, 250 и 600 м от поселения), как правило, значения $C_{\text{мик}}$ –СИД заметно больше $C_{\text{мик}}$ –ДНК.

В почве, непосредственно прилегающей к поселению, наблюдалась аналогичная ситуация, как и с террасовой почвой на известняках: полученные значения $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ оказались больше, по-видимому, за счет высокой концентрации внеклеточной ДНК. В то же время на удалении более 500–700 м от поселения, где почвы не удобрялись и содержание $S_{\text{орг}}$ заметно меньше, значения микробной биомассы, рассчитанные по концентрации ДНК, близки к биомассе, определенной методом СИД. В почвах с высоким содержанием органического вещества ослабляется взаимосвязь между концентрацией дцДНК и $S_{\text{мик}}-\text{СИД}$ и увеличивается величина коэффициента пересчета $F_{\text{ДНК}}$. Выделение дцДНК может быть существенно затруднено в почвах с высоким содержанием органического вещества. Так, не удалось выявить прямую взаимосвязь между концентрацией ДНК и углеродом микробной биомассы в лесных подстилках под туей (*Thuja plicata*) и тсугой (*Tsuga heterophylla*) (Британская Колумбия, Канада) [23].

Тесная коррекционная связь выявлена в почвах естественных пастбищ сухостепной зоны (рис. 4f), где коэффициент пересчета $F_{\text{ДНК}}$ из уравнения регрессии составил 4.78 ($R^2 = 0.81$). Занижение коэффициентов пересчета и детерминации обусловлено высокими значениями рН и большим содержанием карбонатов в почвах. На этом ключевом участке в верхних горизонтах почв, как правило, значения $S_{\text{мик}}-\text{СИД}$ больше $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$. При этом оба метода давали практически одинаковую биомассу в солонцах и каштановых почвах в зоне интенсивного выпаса, а также в каштановой почве в зоне умеренного выпаса. Несмотря на сильнощелочную реакцию среды, меньшие значения $S_{\text{мик}}-\text{СИД}$ относительно $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ наблюдались только в каштановой почве и солонце среднем в зоне сильного выпаса, и в солонце среднем в зоне эпизодического выпаса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают, что определение количества почвенной дцДНК является надежным альтернативным методом определения микробной биомассы в антропогенно-преобразованных почвах. В результате анализа широкого ряда почв, различающихся по физико-химическим, биологическим свойствам, интенсивности и длительности антропогенного преобразования, уточнены коэффициенты пересчета концентрации дцДНК в углерод микробной биомассы. Показано, что в связи со слабой чувствительностью метода СИД в сильнощелочных почвах сухостепной зоны наиболее предпочтительным и надежным способом исследования микробной биомассы является метод определения содержания дцДНК в почвах.

Максимальная точность определения $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ имеет место в почвах средне- и тяжелосуглинистого гранулометрического состава с содержанием органического углерода <2% и микробной биомассой <700 мкг С/г сухой почвы. Отклонение от этих параметров снижает достоверность пересчетного коэффициента. Так, в почвах легкого гранулометрического состава отмечается уменьшение значений $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$, в связи с меньшей сохранностью ДНК в почве. В почвах с высоким содержанием органического углерода, напротив, наблюдается завышение $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ за счет внеклеточной ДНК, источником которой являются растительные остатки и мертвые микробные клетки. Если говорить о литологических условиях, то наиболее надежные данные по $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ можно получить для почв средне- и тяжелосуглинистого гранулометрического состава, развитых на глинистых сланцах и карбонатных породах. Высокое содержание глины, ила и обменных оснований (в первую очередь Ca^{2+}) замедляет скорость минерализации почвенного органического вещества и повышает сохранность ДНК в почве. И напротив, в почвах на кислых породах с низким содержанием ила и низкой степенью насыщенности основаниями условия для сохранения дцДНК наименее благоприятные (почвы на песчаниках). В таких случаях пересчетный коэффициент $F_{\text{ДНК}}$ оказывается, как правило, ниже.

Предположение о влиянии антропогенной деятельности в древности и в настоящее время на взаимосвязь содержания дцДНК и микробной биомассы подтвердилось лишь частично. Наибольшее ослабление корреляционной связи наблюдалось в древних унавоженных почвах окрестностей поселения Подкумское-3. Распашка с внесением высоких доз органических удобрений на протяжении 200–300 лет привела к накоплению и стабилизации органического вещества, сохранению внеклеточной ДНК как микробного, так и растительного происхождения. Это мешает точному определению $S_{\text{мик}}-\text{ДНК}$ и ослабляет взаимосвязь микробной биомассы и концентрацией ДНК в почве. В почвах земледельческих террас Восточного Кавказа, где практиковалась экстенсивная система земледелия с меньшими нормами внесения органических удобрений, ослабление корреляционной связи между содержанием дцДНК и $S_{\text{мик}}-\text{СИД}$ не наблюдалось. То же можно сказать и о почвах естественных пастбищ. Интенсивная пастбищная нагрузка приводит к уменьшению микробной биомассы в целом, но соотношение $S_{\text{мик}}-\text{СИД}$ и концентрации ДНК в почве не изменяется в условиях перевыпаса. Можно заключить, что на взаимосвязь количества почвенной ДНК и микробной биомассы в почвах в большей степени оказывает влияние не хозяйственное использование, а

почвенные условия: содержание органического углерода, гранулометрический состав, насыщенность основаниями и биологическая активность.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-68-00010, <https://rscf.ru/project/22-68-00010/>. В работе использованы материалы, полученные при выполнении госзадания № 0191-2019-0046.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблица S1. Некоторые физические и химические свойства изученных почв.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агроклиматические ресурсы Калмыцкой АССР. Л.: Гидрометеорологическое изд-во, 1974. 124 с.
2. Агроклиматические ресурсы Ставропольского края. Л.: Гидрометеорологическое изд-во, 1971. 238 с.
3. Борисов А.В., Каширская Н.Н., Ельцов М.В., Пинской В.Н., Плеханова Л.Н., Идрисов И.А. Почвы древних земледельческих террас Восточного Кавказа // Почвоведение. 2021. № 5. С. 542–557. <https://doi.org/10.31857/S0032180X2105004X>
4. Минкин М.Б., Бабушкин В.М., Садименко П.А. Солонцы юго-востока Ростовской области. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1980. 271 с.
5. Теории и методы физики почв. Коллективная монография / Под ред. Е.В. Шеина и Л.О. Карпачевского. М.: Гриф и К, 2007. 616 с.
6. Anderson J.P.E., Domsch K.H. Physiological method for quantitative measurement of microbial biomass in soils // Soil Biol. Biochem. 1978. V. 10. P. 215–221. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90099-8)
7. Anderson T.-H., Martens R. DNA determinations during growth of soil microbial biomasses // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 57. P. 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.09.031>
8. Bachoon D.S., Otero E., Hodson R.E. Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization // J. Microbiological Methods. 2001. V. 47. P. 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00296-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00296-2)
9. Beck T., Joergensen R.G., Kandeler E., Makeschin F., Nuss E., Oberholzer H.R., Scheu S. An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass // Soil Biol. Biochem. 1997. V. 29. P. 1023–1032. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00030-8)
10. Blagodatskaya E.V., Blagodatskii S.A., Anderson T.-H. Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils of natural and agricultural ecosystems // Microbiology. 2003. V. 72(6). P. 744–749. <https://doi.org/10.1023/B:MICI.0000008379.63620.7b>
11. Blum S.A.E., Lorenz M.G., Wackernagel W. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils // Systematic and Applied Microbiology. 1997. V. 20. P. 513–521. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80021-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80021-5)
12. van den Boogaart K.G., Filzmoser P., Hron K., Templ M., Tolosana-Delgado R. Classical and robust regression analysis with compositional data // Mathematical Geosciences. 2021. V. 53. P. 823–858. <https://doi.org/10.1007/s11004-020-09895-w>
13. Chernysheva E., Khomutova T., Fornasier F., Kuznetsova T., Borisov A. Effects of long-term medieval agriculture on soil properties: A case study from the Kislovodsk basin, Northern Caucasus, Russia // J. Mountain Sci. V. 15. P. 1171–1185. <https://doi.org/10.1007/s11629-017-4666-7>
14. Crecchio C., Stotzky G. Binding of DNA on humic acids: effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase // Soil Biol. Biochem. 1998. V. 30. P. 1060–1067. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00248-4)
15. Fornasier F., Ascher J., Ceccherini M.T., Tomat E., Pietramellara G. A simplified rapid, low-cost and versatile DNA-based assessment of soil microbial biomass // Ecological Indicators. 2014. V. 45. P. 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.03.028>
16. Gangneux C., Akpa-Vincesla M., Sauvage H., Desaire S., Houot S., Laval K. Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: relationships with chloroform-labile carbon // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 43. P. 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.012>
17. Georgiou C.D., Papapostolou I. Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA // Analyt. Biochem. 2006. V. 358. P. 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.07.035>
18. Gong H., Du Q., Xie S., Hu W., Akram M.A., Hou Q., Dong L., Sun Y., Manan A., Deng Y., Ran J., Deng J. Soil microbial DNA concentration is a powerful indicator for estimating soil microbial biomass C and N across arid and semi-arid regions in northern China // Appl. Soil Ecology. 2021. V. 160. P. 103863. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103869>
19. Griffiths, B.S., Díaz-Raviña, M., Ritz, K., McNicol, J.W., Ebbelwhite, N., Bååth, E. Community DNA hybridisation and % G + C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. V. 24. P. 103–112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00427.x>
20. Homburg J.A., Sandor J.A. Anthropogenic effects on soil quality of ancient agriculture systems of the American Southwest // Catena. 2011. V. 85. P. 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2010.08.005>

21. Joergensen R.G., Emmerling C. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils // *J. Plant Nutrition Soil Sci.* 2006. V. 169. P. 295–309. <https://doi.org/10.1002/jpln.200521941>
22. Khomutova T.E., Fornasier F., Yeltsov M.V., Chernysheva E.V., Borisov A.V. Influence of grazing on the structure and biological activity of dry steppe soils of the southern Russian Plain // *Land Degradation Development.* V. 32. P. 4832–4844. <https://doi.org/10.1002/ldr.4032>
23. Leckie S.E., Prescott C.E., Grayston S.J., Neufeld J.D., Mohn W.W. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus // *Soil Biol. Biochem.* V. 36. P. 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.014>
24. Levy-Booth D.J., Campbell R.G., Gulden R.H., Hart M.M., Powell J.R., Klironomos J. N., Pauls K.P., Swanton C.J., Trevors J.T., Dunfield K.E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39. P. 2977–2991. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
25. Lloyd-Jones G., Hunter D.W.F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils // *Soil Biol. Biochem.* 2001. V. 33. P. 2053–2059. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00133-X)
26. Lorenz M.G., Wackernagel W. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. P. 2948–2952. <https://doi.org/10.1128%2Faem.53.12.2948-2952.1987>
27. Marstorp H., Witter E. Extractable dsDNA and product formation as measures of microbial growth in soil upon substrate addition // *Soil Biol. Biochem.* 1999. V. 31. P. 1443–1453. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00065-6)
28. Morrissey E.M., McHugh T.A., Preteska L., Hayer M., Dijkstra P., Hungate B.A., Schwartz E. Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil // *Soil Biol. Biochem.* 2015. V. 86. P. 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.020>
29. Mueller T., Joergensen R.G., Meyer B. Estimation of soil microbial biomass C in the presence of living roots by fumigation-extraction // *Soil Biol. Biochem.* 1992. V. 24. P. 179–181. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90275-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90275-3)
30. Muneer M., Oades J.M. The role of Ca-organic interactions in soil aggregate stability. 1. Laboratory studies with glucose-C-14, CaCO₃ and CaSO₄·H₂O // *Austral. J. Soil Res.* 1989. V. 27. P. 389–399. <https://doi.org/10.1071/SR9890389>
31. Muneer M., Oades J.M. The role of Ca-organic interactions in soil aggregate stability. 2. Field studies with C-14-labeled straw, CaCO₃ and CaSO₄·H₂O // *Austral. J. Soil Res.* 1989b. V. 27. P. 401–409. <https://doi.org/10.1071/SR9890401>
32. Paget E., Monrozier L.J., Simonet P. Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 97. P. 31–40. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90359-V](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90359-V)
33. Semenov M., Blagodatskaya E., Stepanov A., Kuzyakov Ya. DNA-based determination of soil microbial biomass in alkaline and carbonaceous soils of semi-arid climate // *J. Arid Environ.* 2018. V. 150. P. 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2017.11.013>
34. Wiesmeier M., Urbanski L., Hobbey E., Lang B., von Lüt-zow M., Marin-Spiotta E., van Wesemael B., Rabot E., Liess M., Garcia-Franco N., Wollschläger U., Vogen H.-J., Kögel-Knabner I. Soil organic carbon storage as a key function of soils - A review of drivers and indicators at various scales // *Geoderma.* 2019. V. 333. P. 149–162. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.026>
35. Yokoyama S., Yuri K., Nomi T., Komine M., Nakamura S., Hattori H., Rai H. The high correlation between DNA and chloroform-labile N in various types of soil // *Appl. Soil Ecol.* 2017. V. 117–118. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.002>

Factors for Conversion of the Content of Double-Stranded DNA to Carbon of Soil Microbial Biomass

E. V. Chernysheva^{1, *}, F. Fornasier², and A. V. Borisov¹

¹*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Pushchino, 142290 Russia*

²*Soliomics, Udine, 33100 Italy*

*e-mail: e.chernysheva@yandex.ru

The relationship between the concentration of soil DNA and microbial biomass, determined by the method of substrate-induced respiration was studied in a wide range of soils differing in particle size distribution, acidity, organic carbon content, microbial biomass, and type of human activity in antiquity and present time. Calcaric Leptosols and Leptic Phaeozems of medieval agricultural lands in the Central Caucasus, Stratozems of agricultural terraces of the late Middle Ages – Modern times in the middle mountain zone of the Eastern Caucasus, as well as Kashtanozems and Solonchets with different grazing intensity in the dry steppe zone (Rostov region) were chosen as the key sites. It has been shown that the determination of soil dsDNA concentration is a reliable and simple method for determining microbial biomass in soils with a

loam texture, organic carbon content less 2%, and microbial biomass less 700 $\mu\text{g C/g}$ of dry soil. The conversion factor F_{DNA} in such soils varied in a narrow range from 5.24 to 5.41. In soils with a high content of organic carbon, an increase of F_{DNA} (6.56 and 10.56) was observed due to the presence of recalcitrant extracellular DNA. Agristratified soil of sandy loam texture was characterized by a lower degree of preservation of dsDNA, which resulted in a decrease in the determined microbial biomass ($F_{\text{DNA}} = 4.22$). A reduced conversion factor F_{DNA} (4.78) was also found in the soils of pastures in the dry steppe zone, which confirms the known limitations of using the substrate-induced respiration method in alkaline soils. Human activity does not significantly affect the relationship between the amount of soil DNA and microbial biomass.

Keywords: substrate-induced respiration, soil DNA, grazing, ploughing, parent materials, ancient and modern human activity

ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

УДК 631.46

ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ В ЗОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫБРОСОВ ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОГО КОМБИНАТА ПЕЧЕНГАНИКЕЛЬ (МУРМАНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

© 2023 г. М. В. Корнейкова^{a, b, *}, Д. А. Никитин^c

^aРоссийский университет дружбы народов,
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198 Россия

^bИнститут проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ РАН,
Академгородок, 14а, Апатиты, 184209 Россия

^cПочвенный институт им. В.В. Докучаева, Пыжевский пер., 7, стр. 2, Москва, 119017 Россия

*e-mail: korneykova.maria@mail.ru

Поступила в редакцию 04.07.2022 г.

После доработки 28.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Проанализированы параметры микробиома Al–Fe-гумусовых подзолов на песчаной морене (Albic Podzols) по градиенту загрязнения соединениями меди, никеля и другими металлами на различном расстоянии (3, 16, 30, 50 км) от горно-металлургического комбината “Печенганикель” (Мурманская область). Проведена оценка запасов и структуры биомассы прокариот и грибов методом люминесцентной микроскопии; определено содержание копий рибосомальных генов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени; изучено таксономическое разнообразие и численность культивируемых почвенных микромицетов. Выявлено увеличение количества копий рибосомальных генов бактерий, архей и грибов вблизи источника выбросов по сравнению с удаленными участками. На всех участках наибольшее количество копий генов отмечено для бактерий от 3.21×10^{10} до 12×10^{10} копий генов/г почвы. Для грибов и архей их количество изменялось в пределах от 0.53×10^{10} до 1.59×10^{10} и от 0.55×10^{10} до 11.41×10^{10} копий генов/г почвы соответственно. Минимум рибосомальных генов всех групп микроорганизмов: архей, бактерии и грибы – выявлен в 50 км от комбината, а максимум – в 3–16 км от источника выбросов. Численность прокариот изменялась от 1.04×10^8 до 8.6×10^8 кл./г почвы, а биомасса – от 0.2 до 18.3 мкг/г почвы. Биомасса грибов варьировала от 122 до 572 мкг/г почвы. Отмечено существенное снижение биомассы всех групп микроорганизмов вблизи завода. Мицелий и споры грибов на всех участках преимущественно представлены мелкими формами диаметром 2–3 мкм. Длина грибного мицелия изменялась от 51.2 м/г вблизи комбината до 397 м/г на удаленных участках, при этом закономерностей в его распределении по градиенту загрязнения не выявлено. Отмечено сокращение разнообразия культивируемых почвенных микромицетов на уровне родов и вышестоящих таксонов по градиенту загрязнения выбросами завода. Выявлена смена структуры сообществ с полидоминантной (фоновый участок) на монодоминантную (вблизи завода). Вид *Penicillium raistrickii* доминировал на всех участках. В зоне 16 км от источника выбросов доминировали представители *Aureobasidium pullulans* и *Trichoderma viride* (16 км), темноокрашенные дрожжи *Torula lucifuga* (3 км). На фоновом участке к доминирующим относились представители порядков *Mucorales* и *Umbelopsidales*.

Ключевые слова: тяжелые металлы, бактерии, археи, микромицеты, биомасса микроорганизмов, количественная ПЦР

DOI: 10.31857/S0032180X22600883, **EDN:** IDXUOP

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время острой проблемой мирового масштаба становится загрязнение окружающей среды. Одними из наиболее актуальных поллютантов выступают тяжелые металлы (ТМ) – химические элементы с плотностью >5 (8) г/см³ или относительной атомной массой >50 [49]. В то же время ТМ часто рассматривают не с химиче-

ской, а с природоохранной и медицинской точек зрения, поскольку они полезны или токсичны при различных условиях и концентрациях [33]. Многие ТМ (Zn, Fe, Cu, Mo, Mn и др.) необходимы для нормальной жизнедеятельности организмов, так как участвуют в окислительно-восстановительных процессах, осморегуляции, формировании кофакторов ферментов и т.д., однако они

становятся чрезвычайно губительными для экосистем в высоких концентрациях [32, 25, 46].

Резкое увеличение мощностей тяжелой промышленности сопряжено с рисками техногенного загрязнения, часто обусловленного ростом концентрации ТМ [6, 7]. Эта проблема особенно актуальна для хрупких арктических экосистем, любое воздействие на которые может привести к необратимым нарушениям [25, 46, 53]. Почва является основой существования и буфером всех наземных экосистем, которая может частично нивелировать негативные последствия загрязнений [7, 24]. Одновременно с этим почва – ведущий резервуар аккумуляции ТМ в биогеоценозах, переполнение которого при катастрофическом загрязнении приводит к нарушению функционирования экосистем и угнетению всей биоты [33, 49].

Почвенные микроорганизмы – неотъемлемый и важный компонент всех наземных экосистем [5]. Для большинства микроорганизмов ТМ малотоксичны, а некоторые прокариоты и грибы способны разлагать соединения ТМ до нетоксичных веществ [31]. Подвижность и биодоступность ТМ для растений и животных снижаются микроорганизмами посредством биосорбции и биоосаждения [57], что способствует иммобилизации ТМ и интоксикации почвы [24]. Микроорганизмы имеют несколько механизмов для смягчения негативных воздействий ТМ. Одним из главных среди них является хелатирование, т.е. образование металлоорганических комплексных соединений, которые обычно осаждаются на клеточных мембранах. Например, эффективными хелаторными метаболитами у грибов являются гликопротеин гломалин, глюканы, хитин и хитозан, связывающие ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} и Zn^{2+} в почве [31]. Кроме того, некоторые прокариоты и грибы снабжены генами, которые позволяют им накапливать ТМ сверх определенного предела, обладают способностью модифицировать или преобразовывать ТМ в менее токсичные формы [31]. В настоящее время эти преимущества активно используются в области биоремедиации почв, загрязненных ТМ [57], в том числе с помощью микоризных грибов [52].

Микроорганизмы являются частью почвенной биоты, наиболее быстро реагирующей на изменения окружающей среды, в том числе на повышенное содержание ТМ [24]. Сокращение численности и таксономического разнообразия микроорганизмов может служить индикатором нарушения экосистем [9, 21]. Особое внимание стоит уделить почвенным грибам, поскольку они в существенной степени определяют здоровье и плодородие почвы [39, 42].

Существуют работы, посвященные изучению влияния выбросов медно-никелевых предприятий на Кольском полуострове, в том числе ком-

бината “Печенганикель”, на физико-химические свойства почв [11, 18, 23, 28], а также исследования по биоремедиации нарушенных территорий этого региона [13, 15, 28]. Почвенная микробиота [1, 6, 7, 15] и влияние ТМ на биологическую активность местных почв [10] изучены мало. В вышеуказанных работах рассматривали только культивируемую часть сообщества почвенных микроорганизмов, что не в полной мере отражает реальную структуру и состояние микробиома [2, 26].

Актуальность исследований возрастает так как с 2020 г. началось закрытие цехов и вывод из эксплуатации комбината “Печенганикель”. Полученные в настоящей работе результаты позволят в дальнейшем проводить оценку скорости восстановления микробного сообщества нарушенных территорий.

Цель работы – изучение количественных показателей (биомассы и содержания рибосомальных копий генов) прокариот и грибов, определение таксономического разнообразия и структуры сообществ культивируемых почвенных микроорганизмов в зоне воздействия выбросов медно-никелевого комбината “Печенганикель”.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика участков. Комбинат “Печенганикель” находится в северо-западной части Кольского полуострова. Климат в районе умеренный, характеризуется сильной изменчивостью, так как подвержен влиянию теплого Северо-Атлантического течения Гольфстрим. С 1998 г. на предприятии добывали и обогащали сульфидные медно-никелевые руды (около 7.5 млн т/год) до файнштейна. В результате дальнейшей переработки получали Ni, Cu, Co и H_2SO_4 , являющиеся приоритетными загрязнителями в зоне воздействия выбросов завода.

Работу проводили на стационарных участках, ранее выделенных сотрудниками лаборатории экологии микроорганизмов ИППЭС КНЦ РАН на основании зонирования территории по степени загрязнения почвы ТМ [7]. Согласно системе, предложенной Обуховым с соавт. [22], выделены следующие зоны по градиенту (трансекте) загрязнения воздушными выбросами комбината “Печенганикель”:

- сильного загрязнения, распространяющаяся до 3 км от источника выбросов;
- среднего загрязнения – от 3 до 16 км;
- слабого – от 16 до 30 км;
- условно фоновый участок на расстоянии от 30 до 50 км от комбината (рис. 1).

Почвы на изучаемой территории представлены Al–Fe-гумусовым подзолами с содержанием в органическом горизонте $\text{C}_{\text{орг}}$ 39.0–55.7% и $\text{N}_{\text{общ}}$ 1.1–1.7%. [7]. В табл. 1 приведена характеристика участков.



Рис. 1. Точки отбора проб. 1 – 3 км, 2 – 16 км, 3 – 30 км, 4 – 50 км.

Отбор почвенных образцов проводили в июне 2019 г. на стационарных участках площадью 100 м², расположенных в 3, 16, 30 и 50 км от завода, из органогенного горизонта по стандартной методике отбора образцов для микробиологического анализа с возможными мерами по предотвращению контаминации. Всего отобрано и проанализировано 100 почвенных образцов. Образцы хранили при температуре –18°C для флуоресцентной микроскопии и при –70°C для молекулярных анализов. Все исследования проводили со свежими образцами в течение 14–21 сут после их отбора.

Численность клеток и биомассу прокариот определяли методом люминесцентной микроскопии (микроскоп Zeiss Axioskop 2 plus, Германия), объектив ×100, масляная иммерсия) с применением флуоресцентного красителя акридинового оранжевого. Десорбцию клеток с почвенных частиц проводили ультразвуком, используя прибор УДНЗ-1 (2 мин, 22 кГц, 0.44 А), а препараты готовили по стандартной методике [8]. Из каждого образца готовили 6 препаратов, в каждом из которых подсчитывали клетки в 30 полях зрения.

Количество грибных пропагул и длину мицелия микобиоты определяли методом люминесцентной микроскопии (микроскоп Биомед 5ПР ЛЮМ, Россия), объектив ×40) с применением флуоресцентного красителя калькофлуор белый. Десорбцию клеток с почвенных частиц проводили вортексом (MSV-3500, Латвия) при скорости 3500 об./мин в течение 10 мин), а приготовление препаратов – по стандартной методике [8]. Из

каждого образца готовили 3 препарата, на каждом из которых подсчитывали клетки в 90 полях зрения. Длину грибного и актиномицетного мицелия в грамме образца определяли по стандартной методике [8].

Количественную оценку содержания рибосомальных генов бактерий, архей и грибов осуществляли методом ПЦР в реальном времени. Для учета архей и бактерий использовали праймеры на ген 16S рРНК, для учета грибов – на регион ITS. Реакцию проводили в амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad). Реакционную смесь готовили из препарата SuperMix Eva Green (Bio-Rad). В качестве количественных стандартов концентрации генов 16S рРНК для бактерий использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона штамма K12 *Escherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*, для грибов – штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Meuye 1B-D1606. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях. Концентрацию генов рассчитывали с помощью программного обеспечения CFX Manager. Количество генов в препаратах ДНК пересчитывали на грамм почвы с учетом разведений и массы навески.

Численность колониеобразующих единиц (КОЕ) и разнообразие культивируемых микроорганизмов сахаролитической группы определяли методом микробиологического посева на среду Чапека с добавлением молочной кислоты (4 мл/л) для ингибирования роста бактерий [8]. Культурально-морфологические признаки измеряли с помощью

Таблица 1. Характеристика участков по градиенту загрязнения от комбината "Печенганикель", $n = 18$

Расстояние от завода, км	Степень загрязнения	Координаты	Растительность	Содержание микроэлемента, мг/кг							
				Ni	Cu	Co	Zn	Cr	Mn	Pb	Cd
3	Сильная	69°23'44" N, 30°10'42" E	Сосняк брусничный с примесью березы	2143 ± 168	1587 ± 162	86 ± 24	159 ± 40	61 ± 7	453 ± 297	29 ± 5	2.3 ± 0.2
16	Средняя	69°21'45" N, 29°52'28" E	Сосняк кустарничковый с примесью березы. Напочвенный покров: брусника > вороника > багульник	182 ± 12	99 ± 6	8 ± 0.4	41 ± 3	3.7 ± 0.5	104 ± 27	12 ± 3	1.3 ± 0.2
30	Слабая	69°17'47" N, 29°34'08" E	Сосняк брусничный с примесью березы. Напочвенный покров: брусника > багульник, лишайники	45 ± 6	33 ± 4	3.2 ± 0.4	68 ± 9	3.6 ± 0.2	27 ± 4	21 ± 0.7	1.0 ± 0.06
50	Отсутствует	69°07'56" N, 29°16'32" E	Сосняк лишайниково-кустарничковый. Напочвенный покров: голубика > черника > вороника, лишайники	22 ± 1.3	26 ± 0.4	1.6 ± 0.03	52 ± 4	2.5 ± 0.03	40 ± 10	35 ± 11	0.9 ± 0

Примечание. В табл. 1 и 3 приведены средние значения ± ошибка среднего.

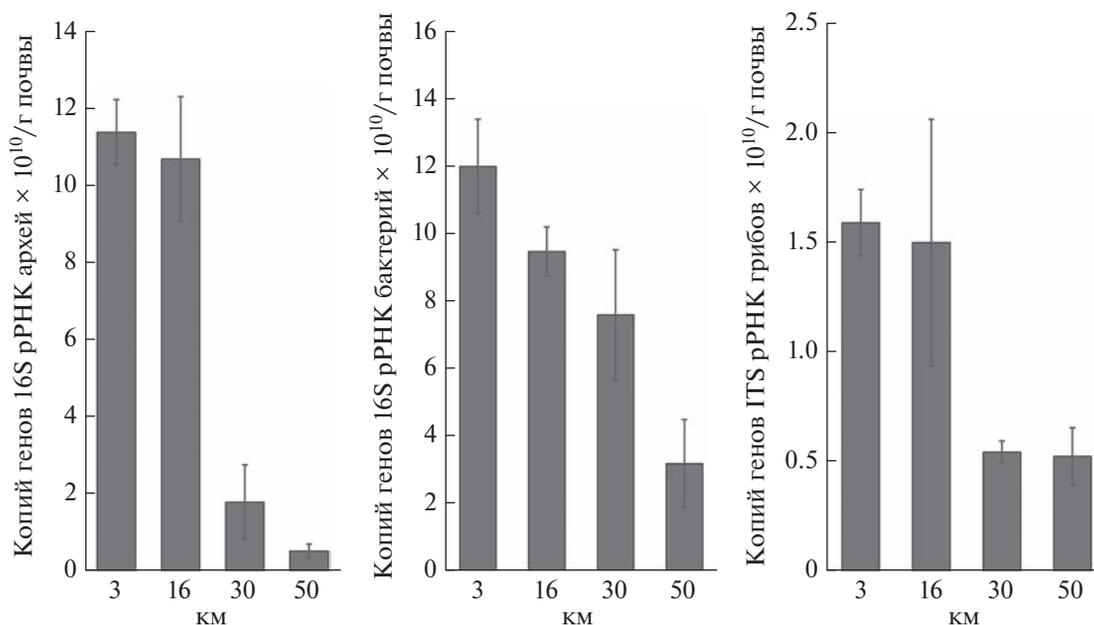


Рис. 2. Количество копий рибосомальных генов архей (а), бактерий (б) и грибов (с) по градиенту загрязнения выбросами медно-никелевого комбината. Приведены средние значения ± ошибка среднего, $n = 30$.

микроскопа Olympus CX41 с использованием определителей [19, 38, 55]. Наименование видов и систематическое положение дано по базе данных: SABI Bioscience Databases (<http://www.indexfungorum.org>). Для ряда видов, выделенных в виде стерильного мицелия, идентификацию осуществляли на основании анализа участка рибосомальных генов ITS1-5.8S-ITS2 рДНК. Выделение ДНК проводили по методике, описанной ранее [3], но культуры подвергали трем циклам обработки, поскольку мицелиальные грибы более устойчивы к внешним воздействиям, чем дрожжи. Секвенирование участков ДНК выполняли с помощью набора реактивов BigDye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 31301 Genetic Analyzer в научно-производственном центре “Синтол” (Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность копий рибосомальных генов 16S рРНК архей в зоне воздействия выбросов медно-никелевого предприятия изменялась от 0.55×10^{10} на фоновом участке до 11.41×10^{10} копий генов/г почвы вблизи завода (рис. 2). На расстоянии 16–30 км от источника выбросов отмечено резкое увеличение количества копий генов архей, в 6 раз и более превышающее фоновое. В ранее проведенных исследованиях на Кольском полуострове не выявлено изменений в численности копий генов этой группы микроорга-

низмов вблизи алюминиевого завода по сравнению с фоном [17]. В городских почвах Кольского полуострова (Апатиты и Мурманск) их количество было близко к нижнему пределу численности на обследуемой территории, а в Мурманске на некоторых участках на 4 порядка меньше [48]. Существенная разница между выявленными значениями численности генов архей может быть объяснена неравномерным распределением генетического материала по клеткам прокариот [34, 37]. Можно отметить, что вблизи медно-никелевого комбината количество копий генов архей было максимальным по сравнению с другими районами полуострова, изученными применяемыми нами методами. Многие представители архей имеют специфическую экологию, из-за уникальной физиологии и биохимии, так как существенная часть архей является хемоавтотрофами [36], они способны использовать в качестве источника энергии ионы некоторых ТМ, обилие и разнообразие которых значительно возрастает вблизи комбината. Увеличение количества генетического материала архей могло происходить в почве по мере приближения к “Печенганикелю” при использовании разных ТМ в качестве субстрата для получения энергии. Часть ТМ могла служить кофактором для работы особых ферментов архей [54]. По-видимому, длительная эволюция архей позволила им сформировать специфические экологические группы, которые более толерантны к ТМ, чем многие другие почвенные микроорганизмы [35]. Невысокая численность генов архей на фоновом участке может быть связана с усиливающейся

Таблица 2. Информация о праймерах и стандартах, используемых в ПЦР в реальном времени

Группа	Целевой ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймеров (F, R)	Стандарты концентрации генов	Ссылка
Бактерии	16S рРНК	Eub338 Eub518	ACCTCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGCTGG	<i>Escherichia coli</i>	[40]
Археи	16S рРНК	915f 1059r	AGGAA TTGGC GGGGG AGCAC GCCAT GCACC WCCTC T	Strain FG08 <i>Halobacterium salinarum</i>	[59]
Грибы	ITS region	ITS1f 5.8s	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G CGC TGC GTT CTT CAT CG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen 1B-D1606	[40]

Таблица 3. Биомасса микроорганизмов и ее структура, $n = 18$

Расстояние от завода, км	Численность прокариот, $\times 10^7$ кл/г	Биомасса прокариот, $\times 10^{-3}$ мг/г	Длина актиномицетного мицелия, м/г	Биомасса актиномицетного мицелия, $\times 10^{-3}$ мг/г	Мицелий ($d = 3$ мкм)			Споры (диаметр, мкм)						Общая биомасса спор, мг/г почвы	Суммарная биомасса грибов, мг/г почвы
					биомасса, мг/г	длина, м	доля мицелия в общей биомассе, %	2		3		5			
								численность, $\times 10^5$ шт./г	масса, мг/г	численность, $\times 10^4$ шт./г	масса, мг/г	численность, $\times 10^3$ шт./г	масса, мг/г		
3	10.4 ± 0.9	0.2 ± 0.0	1.7 ± 0.3	0.06 ± 0.0	0.06 ± 0.008	51.2 ± 6.6	52.7 ± 4.8	0.81 ± 0.01	0.027 ± 0.001	2.41 ± 0.34	0.030 ± 0.004	—	—	0.126 ± 0.004	0.397 ± 0.005
1	21.6 ± 1.2	0.5 ± 0.0	22.6 ± 1.7	0.85 ± 0.0	0.49 ± 0.09	396.9 ± 64.91	84.6 ± 3.04	1.34 ± 0.09	0.045 ± 0.003	2.74 ± 0.16	0.032 ± 0.002	0.87 ± 0.20	0.052 ± 0.002	0.100 ± 0.006	0.449 ± 0.089
6	86.6 ± 2.2	18.3 ± 0.0	16.4 ± 7.5	0.61 ± 0.2	0.35 ± 0.04	276.7 ± 28.95	75.8 ± 3.42	0.93 ± 0.06	0.031 ± 0.002	3.81 ± 0.71	0.044 ± 0.008	3.12 ± 0.43	0.024 ± 0.011	0.083 ± 0.020	0.572 ± 0.025
0	70.9 ± 24.3	2.9 ± 0.9	20.5 ± 8.8	0.77 ± 0.33	0.27 ± 0.01	214.5 ± 10.4	68.7 ± 3.4	0.66 ± 0.05	0.022 ± 0.002	5.68 ± 2.16	0.066 ± 0.025	6.93 ± 1.25	0.037 ± 0.007	0.057 ± 0.023	0.122 ± 0.031

конкуренцией представителей данного домена с бактериями в условиях ограниченности ресурсов питания и энергии [26, 36], характерных для поллярных экосистем.

Численность копий генов 16S рРНК бактерий была приблизительно на том же уровне, что и архей, и изменялась от 3.21×10^{10} до 12×10^{10} копий генов/г почвы. В отличие от архей численность копий генов бактерий постепенно увеличивалась от фонового участка к источнику выбросов (рис. 2). Данный результат можно объяснить повышенной устойчивостью и даже тропизмом отдельных таксонов почвенных бактерий к ТМ [51, 58]. Небольшие концентрации ТМ способствуют лучшему росту некоторых штаммов бактерий, поскольку напрямую вовлечены в пути их метаболизма [51]. Количество копий генов бактерий вблизи завода было максимальным по сравнению с другими антропогенно-измененными и фоновыми участками Кольского полуострова [48]. В почвах городов района исследований, вблизи алюминиевого

предприятия и на побережье Баренцева моря обнаружено схожее по порядку количество копий генов бактерий [48].

Численность рибосомальных генов ITS рРНК грибов была на порядок меньше, чем бактерий и архей, и изменялась от 0.53×10^{10} до 1.59×10^{10} копий генов/г почвы. По-видимому, это обусловлено неравномерностью распределения генетического материала грибов по клеткам, которые могут содержать, как по одному, так и по несколько ядер с различной концентрацией ДНК [44]. Диапазон колебаний численности копий генов грибов по градиенту загрязнения незначительный по сравнению с археями и бактериями. Как и для группы архей, отмечено резкое увеличение количества копий генов на расстоянии 16–30 км от источника выбросов. Известно, что грибы относительно устойчивы к ТМ и способны накапливать их в больших количествах. Почвенные грибы обладают разносторонними и узкоспециализированными физиологическими механизмами, кото-

рые действуют как фильтр для блокирования ТМ в их мицелии [52]. Грибы в загрязненных экосистемах часто накапливают больше ТМ, чем те же виды в фоновых экосистемах [4]. Для сравнения в городских почвах Кольского Севера [48] и на побережье Баренцева моря их численность была на 1–3 порядка меньше [48].

Микробная биомасса и ее структура. Методом прямого учета выявлена существенная разница в численности прокариот по градиенту загрязнения (табл. 3). Зависимость была противоположной результатам по количеству копий генов. Численность прокариот изменялась от 86.6×10^7 кл./г почвы на фоновом участке до 10.4×10^7 кл./г почвы вблизи завода. На расстоянии 16–30 км от источника выбросов отмечается наиболее существенное сокращение численности прокариот по сравнению с фоном. Диапазон колебаний значений биомассы прокариот в почве на разном расстоянии от завода существенен – от 0.2 до 18.3×10^{-3} мг/г почвы с максимальным значением в зоне среднего загрязнения. Рост численности прокариот в почвах, удаленных от комбината “Печенганикель” более чем на 30 км, по-видимому, обусловлен увеличением сомкнутости и видовой сменой растительного покрова. Другое таксономическое разнообразие сообществ растений формирует специфические ризосферные локусы, что приводит к росту общей численности микроорганизмов в почве [27]. Отметим, что ризосферный эффект наиболее ярко проявляется в бедных почвах приполярных регионов [13].

Отмечается существенное уменьшение длины и биомассы мицелия актиномицетов вблизи комбината (зона 3 км) – 1.7 и 0.06×10^{-3} мг/г соответственно, тогда как на удаленных участках (16–50 км) эти параметры изменялись от 16.4 до 22.6 и от 0.61 до 0.85×10^{-3} мг/г соответственно. Данную закономерность можно объяснить значительной чувствительностью группы актиномицетов к различным негативным факторам по сравнению с грибами или бактериями [56]. Для сравнения вблизи алюминиевого предприятия актиномицеты были наиболее устойчивой частью микробного сообщества: снижение активности конкурентных микроорганизмов, изменение рН почвы в щелочную сторону позволило им развиваться даже при наличии высокого количества загрязнителей [17]. При этом выбросы завода не оказывали влияния на численность и биомассу других групп прокариот. Факт угнетения актиномицетов в зоне воздействия медно-никелевого и стимуляции вблизи алюминиевого завода и ранее отмечен для культивируемой микробиоты [1, 7, 17].

Выявлено существенное (на порядок) угнетение грибного мицелия вблизи медно-никелевого комбината по сравнению с удаленными участками. На расстоянии 16 км (в зоне среднего загряз-

нения) отмечались максимальные значения биомассы и длины мицелия, они составили 0.49 и 396.9 мг/г почвы соответственно. В ранее проведенных работах вблизи медно-никелевого комбината выявлено снижение грибной биомассы по сравнению с удаленными участками, ее значения были на порядок выше [15], чем в настоящем исследовании. Можно предположить, что почти десятилетнее воздействие комбината оказало угнетающее воздействие на почвенные микроскопические грибы. В предшествующих работах определение грибной биомассы проводили по иной методике [50] без деления на споры и мицелий, поэтому сравнение полученных результатов не считаем корректным. Для сравнения в зоне воздействия алюминиевого завода в рассматриваемом районе Кольского полуострова отмечалось небольшое увеличение биомассы и длины грибного мицелия, существенных изменений по градиенту загрязнения не выявлено [17]. В целом биомасса почвенных грибов на исследуемой территории была существенно больше, чем в городских почвах Апатитов, и меньше, чем в Мурманске [16, 48].

Длина грибного мицелия в исследованных почвах варьировала от 51.2 до 396.9 мг/г почвы. Как и в случае биомассы, максимальные значения отмечались на расстоянии 16 км от источника выбросов, а минимальные – в 3 км зоне. Более половины грибной биомассы (69–85%) приходилось на мицелий в почве удаленных участков (16 км и далее), тогда как вблизи комбината только 52% грибов имели мицелиальную форму. Отмечалось увеличение доли спор вблизи источника выбросов. Такая тенденция наблюдалась для всех антропогенно-нарушенных почв Кольского полуострова [47, 48] и других регионов [30].

Несмотря на то, что почва – естественная среда обитания большей части грибов, в ней часто складываются неблагоприятные условия для развития пропагул микробиоты [8, 43]. Поэтому необходимо оценивать не только долю активной биомассы – мицелия, но и процент покоящихся клеток [21]. Численность грибных спор изменялась от нескольких сотен до нескольких сотен тысяч на грамм почвы, что на порядок меньше, чем для почв Большеземельской тундры [12], но соответствует результатам для почв баренцевоморского побережья Кольского полуострова [47]. На участках, расположенных в 16 км и далее от источника выбросов, 96% спор представлено мелкими формами до 3 мкм (табл. 3), что характерно для почв полярных регионов [20]. Крупные споры встречались только на удаленных участках и составляли 1–3% от общей биомассы спор. Наименьшая численность и биомасса крупных спор отмечена на сильнозагрязненном участке. Большая часть (от 65 до 100%) пропагул микробиоты представлена экземплярами мелкого размера, 2–3 мкм. Наименьшая доля мелких пропагул (65–88%) выявле-

Таблица 4. Таксономическое разнообразие комплексов микроскопических грибов по градиенту загрязнения выбросами медно-никелевого комбината

Вид	Расстояние от завода, км			
	3	16	30	50
Отдел Ascomycota Класс Dothideomycetes Порядок Capnodiales Семейство Cladosporiaceae				
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	–	8.3	3.2	2.1
Порядок Dothideales Семейство Saccotheciaceae				
<i>Aureobasidium melanogenum</i> (Herm.-Nijh.) Zalar, Gostinčar & Gunde-Cim.	–	–	28.8	12.1
<i>A. pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud	11.2	38.5	5.6	4.3
Порядок Pleosporales Семейство Didymellaceae				
<i>Juxtiphoma eupyrena</i> (Sacc.) Valenz.-Lopez, Crous, Stchigel, Guarro & Cano	–	–	–	13.2
Семейство Pleosporaceae				
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	–	0.5	0.8	–
Семейство Torulaceae				
<i>Torula lucifuga</i> Oudem.	65.2	–	–	–
Класс Eurotiomycetes Порядок Eurotiales Семейство Aspergillaceae				
<i>Penicillium canescens</i> Sopp	–	–	–	3.5
<i>P. chermesinum</i> Biourge	–	–	–	2.3
<i>P. decumbens</i> Thom	–	–	5.6	–
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	–	–	–	33
<i>P. hirsutum</i> var. <i>hirsutum</i> Dierckx	–	1.3	3.0	2.1
<i>P. implicatum</i> Biourge	–	–	–	3.3
<i>P. lividum</i> Westling	–	–	–	1
<i>P. miczynskii</i> K.M.Zaleski*	3.2	3.1	46.8	14
<i>P. raistrickii</i> G. Sm.	29.4	51.6	27.6	24.7
<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	–	–	2.5	–
<i>P. spinulosum</i> Thom*	5.5	9.8	9.4	34.1
<i>P. thomii</i> Maire*	–	13.2	10.1	25.4
Класс Leotiomycetes Порядок Helotiales Семейство Muxotrichaceae				
<i>Muxotrichum deflexum</i> Berk.	–	–	–	10.2

Таблица 4. Окончание

Вид	Расстояние от завода, км			
	3	16	30	50
Класс Sordariomycetes Порядок Нурocreales Семейство Нурocreaceae				
<i>Trichoderma viride</i> Pers.*	–	29.7	–	3.8
Семейство Incertae sedis				
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>murorum</i> (Corda) S. Hughes	–	–	–	1.8
Семейство Stachybotryaceae				
<i>Stachybotrys echinatus</i> (Rivolta) G. Sm.	–	–	–	1.5
Отдел Mucoromycota Класс Mucoromycetes Порядок Incertae sedis Семейство Cunninghamellaceae				
<i>Gongronella butleri</i> (Lendn.) Peyronel & Dal Vesco	0.3	2.2	–	–
Порядок Mucorales Семейство Mucoraceae				
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	2.7	3.3	0.7	2.3
Класс Umbelopsidomycetes Порядок Umbelopsidales Семейство Umbelopsidaceae				
<i>Umbelopsis</i> sp.	–	–	–	53.3
<i>U. angularis</i> W. Gams & M. Sugiy*	–	–	–	42.4
Всего видов	7	11	12	21

* Виды, для которых был сделан молекулярно-генетический анализ.

Примечание. Жирным шрифтом выделены доминирующие виды (с наибольшим индексом обилия).

на в почвах, наиболее удаленных от комбината, где отмечены крупные споры и дрожжи диаметром 5 мкм. Такой факт может свидетельствовать о сильном стрессовом воздействии ТМ у комбината, которое сокращает долю крупных клеток грибов [4, 45]. Около 68% выявленных пропагул грибов имело округлую форму с гладкой поверхностью; 15% округлые и шероховатые; 12% – овальные с гладкой поверхностью; 5% – имеют овальную форму с неровностями.

Таксономическое разнообразие микромицетов в почве по градиенту загрязнения от комбината “Печенганикель” представлено 26 видами, 13 родами, 13 семействами (Aspergillaceae, Cladosporiaceae, Cunninghamellaceae, Didymellaceae, Нурocreaceae, Mucoraceae, Мухотрихaceae, Pleosporaceae, Saccotheciaceae, Stachybotryaceae, Torulaceae, Umbelopsidaceae, Incertae Sedis), 9 порядками (Capnodiiales, Dothideales, Eurotiales, Helotiales, Нурocreales,

Mucorales, Pleosporales, Umbelopsidales, Incertae Sedis), 6 классами (Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes, Mucoromycetes, Umbelopsidomycetes), 2 отделами (Ascomycota, Mucoromycota) (табл. 4).

Выявлено сокращение видового разнообразия микроскопических грибов по мере приближения к источнику выбросов. Если на фоновом участке таксономическое разнообразие микромицетов представлено 21 видом, то на расстоянии 30–16 км оно существенно сократилось до 12–10 видов соответственно. В зоне сильного загрязнения оно представлено всего 7 видами. В почве исследуемых участков по разнообразию доминировали грибы рода *Penicillium*, как и на всем Кольском полуострове, они составили почти 50% от общего количества выделенных видов. В число доминирующих по обилию в почве всех участков входили представители *Penicillium raistrickii*. Данный вид

относится к часто встречающимся на Кольском полуострове [14]. В зоне 16 км от источника выбросов доминировали представители *Aureobasidium pullulans* и *Trichoderma viride* (16 км), темноокрашенные дрожжи *Torula lucifuga* (3 км). Доминирование темноокрашенных микромицетов в антропогенно-нарушенных почвах отмечалось и ранее [29, 41]. По мере удаления от источника выбросов структура грибного сообщества менялась с монодоминантной на полидоминантную. На расстоянии 30–50 от источника выбросов отмечалось увеличение количества доминирующих видов.

Степень сходства видового состава комплексов микроскопических грибов сильнозагрязненного и фонового участков составляла всего 34%, тогда как для других участков 50–82%. Полученные результаты свидетельствуют о существенном изменении видового состава комплексов почвенных микромицетов вблизи комбината по сравнению с фоном.

Наибольшее видовое разнообразие грибов характерно для 30–50 км зоны: 11 видов встречались только на этих участках (*Gliomastix murorum* var. *murorum*, *Juxtiphoma eupyrena*, *Muxotrichum deflexum*, *Penicillium canescens*, *P. chermesinum*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. lividum*, *Stachybotrys echinatus*, *Umbelopsis* sp., *U. angularis*) и не были выделены из почвы участков, расположенных ближе к комбинату “Печенганикель”. Грибы порядка Mucorales и Umbelopsidales являются типичными представителями почв холодных и умеренно-холодных регионов, относятся к группам психротолерантов и олиготрофов [38]. В фоновых почвах отмечено их большое разнообразие и обилие.

Поскольку видовое разнообразие и структура грибных сообществ зависят от множества факторов (погодные условия, физико-химические свойства почвы, особенности процедуры отбора образцов и их анализа и пр.), полученные в разное время результаты имеют ряд сходств и различий. Выявленные общие для разных периодов исследований тенденции: уменьшение видового разнообразия по мере приближения к источнику выбросов, доминирование темноокрашенных микромицетов вблизи комбината, а представителей отдела Mucoromycota – на фоновой территории позволяют определить чувствительные и устойчивые виды микроскопических грибов и использовать их в целях биоиндикации нарушенных экосистем. Наибольший потенциал к ремедиации загрязненных территорий отмечен у толерантных к ТМ штаммов *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma viride* и *Torula lucifuga*. По всей видимости они способны адсорбировать и обезвреживать поллютанты, рационально заняться разработкой биопрепаратов-ремедиантов на основе пропагул данных микромицетов. В дальнейшем перспективно продолжить работу в направлении поиска микроорга-

низмов, способных восстановить территории горно-металлургического комбината в условиях Арктики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбросы медно-никелевого комбината, расположенного на Кольском полуострове, оказали существенное влияние на количественные и качественные показатели почвенных микробных сообществ. Выявлено увеличение количества копий генов всех групп микроорганизмов по мере приближения к источнику выбросов. Вблизи комбината “Печенганикель” обнаружено наибольшее количество копий генов архей, бактерий и грибов по сравнению с другими районами Кольского полуострова, как фоновыми, так и антропогенно-измененными, что может быть связано с ростом доли штаммов, толерантных к ТМ.

Биомасса прокариот, напротив, уменьшалась по мере приближения к заводу. Грибная биомасса практически не изменялась по градиенту загрязнения, что свидетельствует об устойчивости этой группы микроорганизмов к выбросам комбината, способности аккумулировать ТМ в мицелии и переводить их в малотоксичное состояние.

Оценка количественных показателей почвенных микробных сообществ с применением разных методов (молекулярно-генетических и флуоресцентной микроскопии), несмотря на противоречивость полученных результатов, очень важна, так как позволяет оценить структуру микробных сообществ и выявить тенденции ее изменений под воздействием выбросов комбината. Различия в результатах могут быть связаны с особенностью методик, специфичностью праймеров в случае молекулярно-генетического анализа и неравномерностью распределения ДНК в клетках микроорганизмов.

Выбросы медно-никелевого комбината оказывают сильное воздействие на культивируемую часть сообщества, что выражается в изменении видового состава и структуры сообществ микроскопических грибов. Выявлено сокращение видового разнообразия комплексов почвенных микромицетов, перестройка структуры их сообществ.

Полученные данные можно использовать в целях биоиндикации нарушенных экосистем. Показано кардинальное изменение структуры биомассы микроорганизмов и смена таксономического состава сообществ почвенных микромицетов с полидоминантной на монодоминантную в зоне воздействия выбросов горно-металлургического комбината. Метод ПЦР в реальном времени также хорошо подходит для выявления нарушенных экосистем, поскольку показал резкое увеличение численности рибосомальных генов всех рассмотренных групп микроорганизмов (археи, бактерии

и грибы) по мере приближения к комбинату. Отмечено, что в зоне наибольшего загрязнения доминировали *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma viride* и *Torula lucifuga*, в то время как на фоновом участке преобладали представители порядков Mucorales и Umbelopsidales. Виды, доминирующие вблизи комбината, могут обладать большим потенциалом к биоремедиации загрязненных ТМ почв и быть использованы для разработки био-препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Экспедиционные работы и отбор почвенных образцов выполнены в рамках темы НИР по госзаданию 122022400109-7, молекулярно-генетические исследования – при поддержке фонда РФФ 19-77-300-12, оценку биомассы микроорганизмов и культивируемой части микробного сообщества проводили в рамках проекта № 202185-2-000 системы грантовой поддержки научных проектов РУДН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Благодатская Е.В., Пампура Т.В., Богомолова И.Н., Копчик Г.Н., Лукина Н.В.* Влияние выбросов медно-никелевого комбината на микробные сообщества почв лесных биогеоценозов Кольского полуострова // Известия РАН. Сер. биологическая. 2008. № 2. С. 232–242.
2. *Вечерский М.В., Семенов М.В., Лисенкова А.А., Степаньков А.А.* Метагеномика – новое направление в экологии // Известия РАН. Сер. биологическая. 2022. № 1. С. 70–81. <https://doi.org/10.31857/S1026347022010152>
3. *Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю.* Особенности динамики эпифитных и почвенных дрожжевых сообществ в зарослях недотроги железноносной на перегнойно-глеевой почве // Почвоведение. 2011. № 8. С. 966–972.
4. *Горбунова Е.А., Терехова В.А.* Тяжелые металлы как фактор стресса для грибов: проявление их действия на клеточном и организменном уровнях // Микология и фитопатология. 1995. № 29(4). С. 63–69.
5. *Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г., Чернов И.Ю., Головченко А.В., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Манучарова Н.А., Марфенина О.Е., Полянская Л.М., Степанов А.Л., Умаров М.М.* Роль микроорганизмов в экологических функциях почв // Почвоведение. 2015. № 9. С. 1087–1096. <https://doi.org/10.7868/S0032180X15090038>
6. *Евдокимова Г.А., Корнейкова М.В., Мозгова Н.П., Редькина В.В.* Микроорганизмы воздушной среды обитания по градиенту загрязнения от комбината “Печенганикель” к заповеднику “Пасвик” // Вестник Кольского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 22–25.
7. *Евдокимова Г.А., Мозгова Н.П., Корнейкова М.В.* Содержание и токсичность тяжелых металлов в почвах зоны воздействия газовой выбросов комбината “Печенганикель” // Почвоведение. 2014. № 5. С. 625–625. <https://doi.org/10.7868/S0032180X14050049>
8. *Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. С. 60.
9. *Иванова Е.А., Першина Е.В., Карпова Д.В., Тхакахова А.К., Железова А.Д., Рогова О.Б., Семенов М.В., Стифеев А.И., Никитин Д.А., Колганова Т.В., Андронов Е.Е.* Прокариотные сообщества почвогрунтов отвалов Курской магнитной аномалии // Экологическая генетика. 2020. № 18(3). С. 331–342. <https://doi.org/10.17816/ecogen17901>
10. *Кадулин М.С., Копчик Г.Н.* 2013. Эмиссия CO₂ почвами в зоне влияния горно-металлургического комбината “Североникель” в Кольской Субарктике // Почвоведение. № 11. С. 1387–1387. <https://doi.org/10.7868/S0032180X13110063>
11. *Кашулина Г.М., Кубрак А.Н., Коробейникова Н.М.* Кислотность почв в окрестностях медно-никелевого комбината “Североникель”, Кольский полуостров // Почвоведение. 2015. № 4. С. 486–486. <https://doi.org/10.7868/S0032180X15040048>
12. *Ковалева В.А., Денева С.В., Панюков А.Н.* Микробиологические показатели почвы постагrogenного биогеоценоза в тундровой зоне // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. 2016. № 4(198). С. 2–9. [https://doi.org/10.31140/j.vestnikib.2016.4\(198\).1](https://doi.org/10.31140/j.vestnikib.2016.4(198).1)
13. *Копчик Г.Н., Копчик С.В., Смирнова И.Е.* Альтернативные технологии ремедиации техногенных пустошей в Кольской Субарктике // Почвоведение. 2016. № 11. С. 1375–1391. <https://doi.org/10.7868/S0032180X16090082>
14. *Корнейкова М.В., Евдокимова Г.А., Лебедева Е.В., Чапоргина А.А.* Комплексы микромицетов в воздухе антропогенно-загрязненных территорий Кольского полуострова // Микология и фитопатология. 2015. № 49(4). С. 218–225.
15. *Корнейкова М.В., Лебедева Е.В.* Комплексы микроскопических грибов в лесных экосистемах в зоне воздействия выбросов медно-никелевых предприятий на Кольском полуострове // Проблемы лесной фитопатологии и микологии / IX Межд. конф., посвященная 90-летию со дня рожд. проф. Н.И. Федорова. Минск, 19–24 октября 2015 г. Минск. 2015. С. 98–101.
16. *Корнейкова М.В., Никитин Д.А., Долгих А.В., Сошина А.С.* Микобиота почв города Апатиты (Мурманская область) // Микология и фитопатология. 2020. № 54(4). С. 264–277. <https://doi.org/10.31857/S0026364820040078>
17. *Корнейкова М.В., Никитин Д.А.* Качественные и количественные характеристики почвенного микробиома в зоне воздействия выбросов Кандалакшского алюминиевого завода // Почвоведение. 2021. № 6. С. 725–734. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21060083>
18. *Кузьменкова Н.В., Кошелева Н.Е., Асадулин Э.Э.* Тяжелые металлы в почвах и лишайниках тундровой и лесотундровой зон (северо-запад Кольского полуострова) // Почвоведение. 2015. № 2. С. 244–244. <https://doi.org/10.7868/S0032180X14100062>

19. Литвинов М.А. Определитель почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1967. 303 с.
20. Никитин Д.А. Экологические особенности грибов Антарктиды // Микология и фитопатология. 2021. № 55(2). С. 79–104.
<https://doi.org/10.31857/S0026364821020070>
21. Никитин Д.А., Семенов М.В., Чернов Т.И., Ксенофонтова Н.А., Железова А.Д., Иванова Е.А., Хитров Н.Б., Степанов А.Л. Микробиологические индикаторы экологических функций почв (обзор) // Почвоведение. 2022. № 2. С. 1–16.
<https://doi.org/10.31857/S0032180X22020095>
22. Обухов А.Я., Ефремова Л.Л. Охрана и рекультивация почв, загрязненных тяжелыми металлами // Тяжелые металлы в окружающей среде и охрана природы. Мат-лы 2-й Всесоюз. конф. М., 1988. Ч. 1. С. 23.
23. Одинов П.Е., Караванова Е.И., Степанов А.А. Трансформация водорастворимых органических веществ подстилок подзолов фоновых и техногенных территорий Кольского полуострова // Почвоведение. 2018. № 8. С. 1022–1032.
<https://doi.org/10.1134/S0032180X18080099>
24. Плеханова И.О., Золотарева О.А., Тарасенко И.Д., Яковлев А.С. Оценка экотоксичности почв в условиях загрязнения тяжелыми металлами // Почвоведение. 2019. № 10. С. 1243–1258.
<https://doi.org/10.1134/S0032180X19100083>
25. Попов С.С., Попова Л.Ф., Малков А.В., Трофимова А.Н., Никитин Д.А. Оценка распределения тяжелых металлов в почвах о. Северный (Новая Земля) // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология. 2022. № 15(1). С. 128–141.
<https://doi.org/10.17516/1997-1389-0379>
26. Семенов М.В. Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // Журн. общ. биол. 2019. № 80(6). С. 403–417.
<https://doi.org/10.1134/S004445961906006X>
27. Семенов М.В., Никитин Д.А., Степанов А.Л., Семенов В.М. Структура бактериальных и грибных сообществ ризосферного и внекорневого локусов серой лесной почвы // Почвоведение. 2019. № 3. С. 355–369.
<https://doi.org/10.1134/S0032180X19010131>
28. Трегубова П.Н., Копиц Г.Н., Степанов А.Л., Степанов А.А., Корнеечева М.Ю., Куприянова Ю.В. Влияние гуминовых препаратов на свойства деградированных почв техногенных пустошей // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2019. № 97. С. 129–149.
<https://doi.org/10.19047/0136-1694-2019-97-129-149>
29. Фокина А.И., Дабах Е.В., Домрачева Л.И., Скугорева С.Г., Лялина Е.И., Ашихмина Т.Я., Зыкова Ю.Н., Леонова К.А. Методические подходы к химико-биологической диагностике состояния почв техногенно-преобразованных территорий // Почвоведение. 2018. № 5. С. 589–600.
<https://doi.org/10.7868/S0032180X18050088>
30. Шумилова Л.П., Куимова Н.Г., Терехова В.А., Александрова А.В. Разнообразие и структура комплексов микроскопических грибов в почвах города Благовещенска // Микология и фитопатология. 2014. № 48(4). С. 240–247.
31. Abdu N., Abdullahi A.A., Abdulkadir A. Heavy metals and soil microbes. // Environ. Chem. Lett. 2017. V. 15(1). P. 65–84.
<https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x>
32. Agarwal S.K. Heavy metal pollution. New Delhi: A.P.H. Publishing Corporation, 2009. 259 p.
33. Alloway B.J. (Ed.). Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. Springer Science & Business Media, 2012. V. 22. P. 597.
34. Andronov E.E., Petrova S.N., Pinaev A.G., Pershina E.V., Rakhimgalieva S.Z., Akhmedenov K.M., Gorobets A.V., Sergaliev N.K. Analysis of the structure of microbial community in soils with different degrees of salinization using T-RFLP and real-time PCR techniques // Eurasian Soil Science. 2012. V. 45(2). P. 147–156.
<https://doi.org/10.1134/S1064229312020044>
35. Baker B.J., De Anda V., Seitz K.W., Dombrowski N., Santoro A.E., Lloyd K.G. Diversity, ecology and evolution of Archaea // Nature Microbiol. 2020. V. 5. P. 887–900.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0741-x>
36. Bergauer K., Sintes E., van Bleijswijk J., Witte H., Herndl G.J. Abundance and distribution of archaeal acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase genes indicative for putatively chemoautotrophic Archaea in the tropical Atlantic's interior // FEMS Microbiology Ecol. 2013. V. 84(3). P. 461–473.
<https://doi.org/10.1111/1574-6941.12073>
37. Boyce K.J., Andrianopoulos A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39(6). P. 797–811.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv035>
38. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi / Ed. W. Gams. Eching: IHW-Verlag, 2007. 627 p.
39. Ferris H., Tuomisto H. Unearthing the role of biological diversity in soil health. Soil Biol. Biochem. 2015. V. 85. P. 101–109.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.037>
40. Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Appl Environ Microbiol. 2005. V. 71(7). P. 4117–4120.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>
41. Fokina N.V., Korneykova M.V., Redkina V.V., Myazjn V.A., Sukhareva T.A. Biological activity and chemical properties of tundra soils of the Chukotka autonomous okrug in conditions of anthropogenic pollution // Eurasian Soil Science. 2022. V. 55. P. 45–55.
<https://doi.org/10.1134/S1064229322010045>
42. Frąc M., Hannula S.E., Bełka M., Jędrzycka M. Fungal biodiversity and their role in soil health // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 707.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
43. Garrett S.D. Soil fungi and soil fertility: an introduction to soil mycology. Elsevier, 2016. 147 p.
44. Glöckner F.O., Yilmaz P., Quast C., Gerken J., Beccati A., Ciuprina A., Bruns G., Yarzac P., Pepliesc J., Westram R., Ludwig W. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools // J. Biotechnology. 2017. V. 261. P. 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198>
45. Gube M. Fungal molecular response to heavy metal stress / Biochem. and molecular biology. Springer, 2016. P. 47–68.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5_4

46. Ji X., Abakumov E., Polyakov V. Assessments of pollution status and human health risk of heavy metals in permafrost-affected soils and lichens: A case-study in Yamal Peninsula, Russia Arctic // *Human and Ecolog. Risk Assessment*. 2019. V. 25(8). P. 2142–2159. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1490887>
47. Korneykova M., Nikitin D.A., Myazin V.A. Qualitative and quantitative characteristics of soil microbiome of Barents Sea coast, Kola Peninsula // *Microorganisms*. 2021. V. 9(10). P. 2126. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102126>
48. Korneykova M.V., Vasenev V.I., Nikitin D.A., Dolgikh A.V., Soshina A.S., Myazin V.A., Nakhaev M.R. Soil microbial community of urban green infrastructures in a polar city // *Urban Ecosystems*. 2022. P. 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11252-022-01233-8>
49. Masindi V., Muedi K.L. Environmental contamination by heavy metals // *Heavy Metals*. 2018. P. 115–132.
50. Olsen R.A., Hovland J. Fungal Flora and Activity in Norway Spruce Needle Litter: Report. Ås: Agricultural University of Norway, 1985.
51. Pal A., Bhattacharjee S., Saha J., Sarkar M., Mandal P. Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: A comprehensive overview // *Critical Rev. Microbiol.* 2022. V. 48(3). P. 327–355. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1970512>
52. Riaz M., Kamran M., Fang Y., Wang Q., Cao H., Yang G., Deng L., Wang Y., Zhou Y., Anastopoulos I., Wang X. Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: a critical review // *J. Hazard. Materials*. 2021. V. 402. P. 123919. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123919>
53. Schmidt N.M., Hardwick B., Gilg O., Høye T.T., Krogh P.H., Meltøje H., Michelsen A., Mosbacher J.B., Raundrup K., Reneerkens J., Stewart L., Wirta H., Roslin T. Interaction webs in arctic ecosystems: Determinants of arctic change? // *Ambiol.* 2017. V. 46. P. 12–25. <https://doi.org/10.1007/s13280-016-0862-x>
54. Seelmann C.S., Willistein M., Heider J., Boll M. Tungstenzymes: occurrence, catalytic diversity and cofactor synthesis // *Inorganics*. 2020. V. 8(8). P. 44. <https://doi.org/10.3390/inorganics8080044>
55. Seifert K.A., Gams W. The genera of Hyphomycetes – 2011 update // *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 2011. V. 27. P. 119. <https://doi.org/10.3767/003158511X617435>
56. Singh S., Pandey S., Chaudhary H.S. Actinomycetes: tolerance against heavy metals and antibiotics // *Int. J. Bioassays*. 2014. V. 3. P. 3376–3383.
57. Sun W., Cheng K., Sun K.Y., Ma X. Microbially mediated remediation of contaminated sediments by heavy metals: a critical review // *Current Poll. Rep.* 2021. V. 7(2). P. 201–212. <https://doi.org/10.1007/s40726-021-00175-7>
58. Van Elsas J.D., Hartmann A., Schloter M., Trevors J.T., Jansson J.K. The bacteria and archaea in soil // *Modern Soil Microbiol.* CRC Press, 2019. P. 49–64.
59. Yu Y., Lee C., Hwang S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci. Technol.* 2005. V. 52. P. 85–91. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0502>

Soil Microbiome in the Impact Zone of the Pechenganikel Plant Emissions (Murmansk Region)

M. V. Korneykova^{1, 2, *} and D. A. Nikitin³

¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

²Institute of North Industrial Ecology Problems, Kola Science Center, Russian Academy of Sciences, Apatity, 184209 Russia

³Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, 119017 Russia

*e-mail: korneykova.maria@mail.ru

The microbial parameters in Albic Podzol soil were analyzed along the pollution gradient (3, 16, 30, 50 km) with Pechenganickel plant emissions (Murmansk region). The amount and structure of the prokaryotes and fungi biomass were assessed by the method of luminescent microscopy; the content of microorganism's ribosomal genes copies was determined by real-time PCR; the taxonomic diversity and abundance of culturable soil microfungi were studied. An increase in the number of genes copies of bacteria, archaea, and fungi close the source of emissions compared to remote areas was revealed. In all plots, the highest number of ribosomal genes copies was found for bacteria (from 3.21×10^{10} to 12×10^{10} per g of soil). For fungi and archaea, the number varied from 0.53×10^{10} to 1.59×10^{10} per g of soil and from 0.55×10^{10} to 11.41×10^{10} gene copies/g of soil, respectively. A significant increase in the actinomycetes biomass close the plant was noted, while the biomass of bacteria and fungi remained practically unchanged at different distances from the emission source. Mycelium and fungal spores in all areas are mainly represented by small forms with a diameter of 2–3 microns. The length of the fungal mycelium varied from 51.2 m/g near the plant to 397 m/g in remote areas, with no regularities in its distribution along the contamination gradient. A decrease in the diversity of soil microfungi at the level of genera and higher taxa along the pollution gradient with plant emissions was noted. A change in the structure of communities from polydominant (background site) to monodominant (near the plant) was revealed. The species *Penicillium raistrickii* dominated in all plots. Fungi *Trichoderma viride*, dark-colored yeasts *Torula lucifuga* (3 km) and *Aureobasidium pullulans* (16 km) also dominated in the zone 16 km from the emission source. In the background area, representatives of the orders *Mucorales* and *Umbelopsidales* were dominant.

Keywords: Kola Peninsula, heavy metals, prokaryotes, fungi, biomass, quantitative PCR