

УДК 631.4:574.47

СТРУКТУРА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА АГРЕГАТОВ ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО В УСЛОВИЯХ КОНТРАСТНЫХ ВАРИАНТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ*

© 2015 г. Е. А. Иванова¹, О. В. Кутова², А. К. Тхакахова², Т. И. Чернов², Е. В. Першина¹, Л. Г. Маркина², Е. Е. Андронов¹, Б. М. Когут²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, 3

²Почвенный институт им. В.В. Докучаева, 119017, Москва, Пыжевский пер., 7

e-mail: ektrivanova@gmail.com

Поступила в редакцию 12.02.2015 г.

Проведено исследование таксономической структуры микробиомов агрегатов различного размера чернозема типичного при помощи секвенирования гена 16S рРНК. Для анализа использовали агрегатные фракции размером <0.25, 2–5 и >7 мм, полученные рассевом почвенных образцов естественной влажности. Наибольшее количество прокариотной биомассы (бактерии, археи) было зафиксировано во фракциях <0.25 мм и агрегатах размером 2–5 мм; при этом биомасса бактерий и архей уменьшалась в ряду залежь > бессменный пар > бессменная озимая пшеница. Наибольшее количество грибов отмечалось во фракции <0.25 мм бессменного пара и во всех исследуемых агрегатных фракциях варианта с бессменной пшеницей. Показано, что система сельскохозяйственного использования оказывает статистически более значимое влияние на структуру прокариотного сообщества чернозема, нежели размер агрегатных фракций. Наибольшим разнообразием отличались образцы залежи, при этом статистически значимые максимумы индексов разнообразия Шеннона и филогенетического разнообразия (PD) были зафиксированы в залежи во фракциях <0.25 и 2–5 мм. В целом фракции мелкого размера (<0.25 мм) отличались большими показателями разнообразия, нежели более крупные структурные отделенности.

Ключевые слова: почвенная структура, система землепользования, метагеном, 16S рРНК, пиросеквенирование, биоразнообразие.

DOI: 10.7868/S0032180X15110088

ВВЕДЕНИЕ

Связь почвенной структуры, органического вещества и микроорганизмов отмечали многие исследователи [31, 32, 35]. Наличие в почве агрегатов различного размера определяет существование в ней микроразнообразия как следствия неравномерности поступления органических остатков и корневых экссудатов, различий в распределении физико-химических условий и минералогического состава, разной величины окислительно-восстановительного потенциала на внешней и внутренней поверхностях структурных отделенностей. Таким образом, посредством формирования различ-

ных макро-, мезо- и микросред, в каждой из которых создаются разные и часто противоположные условия для развития отдельных групп микроорганизмов, почвенные агрегаты различного размера оказывают существенное влияние на таксономический состав и определяют функциональное состояние микробиома в целом.

Согласно концептуальной модели иерархии агрегатов, микроорганизмы принимают активное участие в формировании и поддержании агрегатной структуры почвы [17, 22, 29, 31]. Элементарные минеральные частицы связываются с органическим веществом бактериального или грибного происхождения, а также полисахаридами растительного происхождения и растительными остатками, что приводит к формированию микроагрегатов, которые, взаимодействуя друг с другом, образуют макроагрегаты [7]. Гидрофобность выделяемых микроорганизмами внеклеточных полисахаридов увеличивает устойчивость почвенных агрегатов [6].

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного фонда. Работы по сбору образцов и агрохимическому анализу почв осуществлялись за счет средств гранта РНФ № 14-26-00079 (сотрудники ФГБНУ Почвенного института им. В.В. Докучаева: О.В. Кутова, А.К. Тхакахова, Б.М. Когут, Т.И. Чернов), пиросеквенирование и анализ данных были проведены за счет финансовой поддержки гранта РНФ 14-26-00094 (сотрудники ФГБНУ ВНИИСХМ Е.А. Иванова, Е.В. Першина, Е.Е. Андронов).

Традиционно изучение микробных сообществ почвенных агрегатов проводилось преимущественно с использованием классических микробиологических методов — культуральных посевов на питательные среды, а также определения дыхания и микробной биомассы [2, 9]. Однако на сегодняшний день существуют молекулярно-экологические исследования, посвященные изучению таксономического разнообразия микробного сообщества в агрегатах различного размера [6, 14, 30], а также внутри и на поверхности почвенных агрегатов [27]. Показана приуроченность микроорганизмов в большей степени к более тонким гранулометрическим фракциям почвенных частиц. Отмечена отрицательная корреляция микробного обилия с увеличением порового пространства внутри агрегата и между соседними агрегатами [13]. Согласно данным пироксвенирования, показано, что макроагрегаты (>250 мкм), характеризующиеся высокими уровнями содержания доступного углерода и азота, содержат в основном бактерии, принадлежащих к филумам *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verucomicrobia* и δ -*Proteobacteria*. В микроагрегатах (53–250 мкм) доминировали бактерии из групп *Rubrobacteriales* и *Chloroflexi* [14, 27, 28, 30].

Важно отметить, что в вышеупомянутых работах практически отсутствуют данные о закономерности в распределении микроорганизмов в макроагрегатах размером >2 мм, количество которых оказывает существенное влияние на водно-физические свойства почв и соотносится с понятием агрономически ценной структуры [3]. При этом мало данных о связи таксономического состава микробиома с агрегатной структурой почвенного матрикса в различных агроэкологических условиях. Выявление микробиологических индикаторов таких процессов, как почвоутомление, ухудшение структуры, а также восстановление почвы, и создание специализированной базы данных на основе микробиологического мониторинга почв сельскохозяйственного назначения может служить основой для формирования системы управления почвенным качеством и оптимизации землепользования.

В связи с этим целью настоящего исследования был анализ состава и структуры микробиома различных агрегатных фракций чернозема типичного в контрастных (“экстремальных”) условиях землепользования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Образцы почв отбирали из пахотного горизонта (0–25 см) типичного чернозема в условиях длительного стационарного опыта на территории Петринского опорного пункта Почвенного института им. В.В. Докучаева и Курского НИИ АПП (Курская обл.). Для целей анализа почвенного

микробиома были отобраны пробы почв из трех контрастных вариантов опыта: 1 — бессменная озимая пшеница с 1964 г., 2 — бессменный пар с 1964 г. (до 1964 г. — 200-летняя пашня) и 3 — участок бессменного пара, отведенный с 1998 г. под залежь и в настоящее время занятый целинной разнотравно-луговой степной растительностью.

Из каждого варианта опыта отбирали 3 монолитных образца естественного сложения размером 25 × 25 × 25 см. С учетом того, что высушивание почвы зачастую дает искаженные, как правило, заниженные результаты численности микроорганизмов (количество бактерий уменьшается в 5–10 раз) и при этом меняется качественный состав микроорганизмов [4], рассев на агрегаты производили из свежих образцов естественной влажности. Почва была рассеяна на ситах: 0.25; 0.5; 1; 2; 3; 5; 7 мм, предварительно стерилизованных 70%-ным этиловым спиртом.

Для анализа структурных особенностей микробного сообщества были рассмотрены контрастные агрегатные фракции — <0.25, 2–5 и более крупные структурные отдельности >7 мм в диаметре.

Определение содержания органического углерода и азота в почвенных пробах проведено методом сухого сжигания на автоматическом макроэлементном C/N-анализаторе Vario MICRO Cube (Elementar, Германия).

ДНК выделяли из 0.2 г почвы после механического разрушения с использованием стеклянных шариков в экстрагирующем буфере: 350 мкл раствора А (натрий-фосфатный буфер — 200 мМ; изотиоцианат гуанидина — 240 мМ; pH 7.0), 350 мкл раствора Б (Трис-HCl — 500 мМ; SDS — 1% по массе к объему; pH 7.0) и 400 мкл смеси фенола с хлороформом (1 : 1). Разрушение образца проводили в течение 40 с при максимальной мощности (скорость 6500 об./мин. — 680 рад./с) с использованием 3D-вращения на гомогенизаторе Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция). Полученный препарат центрифугировали при максимальной скорости 16000 об./мин (1700 рад./с) в течение 5 мин. Водную фазу отбирали и повторно экстрагировали хлороформом. ДНК осаждали, добавляя равный объем изопропилового спирта. После центрифугирования осадок промывали 70% этанолом и растворяли в воде при 65°C в течение 5–10 мин. Очистку ДНК проводили с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим выделением ДНК из геля методом сорбции на оксиде кремния [1].

Количественный учет бактериального, архейного и грибного компонентов в микробиомах исследуемых образцов проводили с использованием количественной полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с детекцией в реальном времени. В качестве контроля для

бактерий использовали клонированные фрагменты рибосомального оперона *Escherichia coli* (Sigma), для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum* [23] для грибов – штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Meyen 1B-D1606 [26].

Для проведения амплификации использовалась смесь SsoFast™ EvaGreen® Supermix (термический профиль: 95°C – 10 с, 50°C – 10 с, 72°C – 20 с; всего 40 циклов). Были использованы следующие праймеры: Eub338/Eub518 – для бактерий [24], arc915f/arc1059r – для архей [36], ITS1f/5.8s – для грибов [19]. Количественные оценки приводились к числу рРНК оперонов на грамм почвы. ПЦР с детекцией в реальном времени проводили в амплификаторе CFX96 Touch (BioRad). Определение для каждого образца проводили в трех повторностях. Обработку результатов количественной ПЦР проводили с использованием программного обеспечения, прилагающегося к прибору CFX96 Touch.

На основании результатов количественной ПЦР, выраженной в количестве копий оперона рРНК на грамм почвы, проводились оценки бактериальной, архейной (количество клеток) и грибной биомассы. Данный параметр используется как правило для анализа относительных количеств микроорганизмов в различных почвах, но вместе с тем позволяет сделать выводы об абсолютном количестве определенной группы микроорганизмов. Число копий рибосомных оперонов в геномах бактерий и грибов, как известно, изменяются в широком диапазоне. Согласно базе данных gnpDB, она составляет в среднем 4.09 для бактерий и 1.76 для архей [21, 25] для дрожжей, это число составляет около 150 копий в геноме [20, 21]. Для грубой оценки, число копий рРНК оперонов в грибах может быть принято за 100; другими словами, если бы все грибное сообщество почвы состояло бы только из дрожжей, его обилие бы составляло одну сотую долю этого числа. Кроме того, данные о среднестатистической численности в образцах почвы рРНК оперонов копий *E. coli* и *H. salinarum* были использованы для расчета численности бактерий и архей, соответственно.

При конструировании и секвенировании ампликонных библиотек очищенный препарат ДНК (по 10–15 нг) использовался в качестве матрицы в реакции ПЦР (температурный профиль: 95°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 30 с; всего 30 циклов) с добавлением термостабильной ДНК-полимеразы Encyclo (“Евроген”, Россия) и универсальных праймеров к вариабельному участку V4 гена 16S-рРНК – F515 (GTGCCAGCMGCGCGGTAА) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) [10]. Кроме того, в праймеры вводили олигонуклеотидные идентификаторы для каждой пробы (20 идентификаторов) и служебные последовательности,

необходимые для пиросеквенирования по протоколу фирмы “Roche” (Швейцария). Подготовку проб и секвенирование выполняли на приборе GS Junior (“Roche”, Швейцария) согласно рекомендациям производителя.

Таксономическую идентификацию нуклеотидных последовательностей и сравнительный анализ микробных сообществ проводили с использованием пакетного продукта QIIME 1.8.0 (www.qiime.com) [12]. Классификацию последовательностей осуществляли с использованием банка данных RDP (Ribosomal Database Project), доступного на сайте <http://rdp.cme.msu.edu/>. В процессе анализа выполняли следующие действия: разделение библиотек по идентификаторам, проверку качества секвенирования и фильтрацию нуклеотидных последовательностей (для анализа использовали только последовательности длиной более 250 пар нуклеотидов (п. н.)), удаление химерных последовательностей посредством модуля ChimeraSlayer, объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с использованием 97%-ного порога сходства методом Uclust с выбором репрезентативных последовательностей по алгоритму “most_abundant”, выравнивание нуклеотидных последовательностей согласно алгоритму PyNast, далее осуществляли построение матрицы генетических расстояний. Для проведения всех вышеперечисленных оценок проводили процедуру нормализации числа последовательностей в выборке по минимальному образцу. ОТЕ, представленные менее чем двумя последовательностями (так называемые “синглтоны”) были удалены из последующего анализа. Все последовательности были депонированы на сервере NCBI Sequencing Read Archive (SRA) (<http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) с присвоением идентификатора (BioProject ID) PRJNA242118.

Для всех образцов был проведен анализ альфа-разнообразия с вычислением индексов: Шеннона ($H = -\sum p_i \ln p_i$, где p_i – доля i -го вида в сообществе), Shannon_evenness (выровненность сообщества, равная $\lg_2(H)$), количество видов (ОТЕ), Чао1 ($Chao1 = Sobs + \frac{a^2}{2b}$, где $Sobs$ – число обнаруженных ОТЕ, a – число ОТЕ, содержащих 1 сиквенс, b – число ОТЕ, содержащих 2 сиквенса), филогенетическое разнообразие (PD) (определяемое как сумма длин ветвей филогенетического дерева, соединяющих все виды в сообществе); и бета-разнообразия: кластерный анализ образцов с использованием алгоритмов “взвешенного” (weighted) и “невзвешенного” (unweighted) unifrac.

Для статистической оценки результатов кластерного анализа использовали метод “джекнайф”

Таблица 1. Доля агрегатных фракций (%) типичного чернозема исследуемого размера при различных способах его использования

Вариант опыта	Размер агрегатов естественного сложения, мм		
	<0.25	2–5	>7
Бессменный пар с 1964 г.	2.5	23.7	22.1
Бессменная озимая пшеница с 1964 г.	2.8	30.1	9.2
Залежь с 1998 г.	2.3	35.8	9.9

(jackknife). Статистическую обработку результатов анализа микробных сообществ агрегатных фракций различных систем земледелия осуществляли посредством статистических тестов и программ, реализованных в пакетах Statistica 10 Enterprise (www.statsoft.com). Для анализа силы фактора системы земледелия и размера агрегатных фракций на агрохимические показатели и особенности микробиомов чернозема типичного использовали модуль General Linear Models (Factorial ANOVA), значимость различий оценивали посредством процедуры post-hoc с использованием критерия Fischer LSD. Для оценки значимости различий в таксономической структуре микробиомных сообществ, вызванных действием различного размера структурных отдельностей и смены агроэкологического воздействия, использовали попарное сравнение выборок непараметрическим критерием Манна–Уитни U test.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассев почвенных образцов на агрегаты. Анализ данных по просеиванию почвенных образцов естественной влажности (табл. 1) показал, что максимальным во всех вариантах было содержание агрегатов размера 2–5 мм. Минимальное количество отмечено для частиц <0.25 мм.

Установлено, что содержание агрегатов размером 2–5 мм в почве вариантов, занятых растительностью (залежь и бессменная озимая пшеница), больше такового под вариантом бессменного пара. Значимое увеличение содержания фракции 2–5 мм зафиксировано для образцов залежи ($p < 0.005$) (по сравнению с вариантом бессменного пара и озимой пшеницы). Также следует отметить, что при бессменном паровании типичного чернозема наблюдается достоверное увеличение ($p < 0.005$) содержания структурных отдельностей >7 мм по сравнению как с залежью, так и бессменной озимой пшеницей.

Анализ общего углерода и азота в исследуемых образцах. Согласно данным дисперсионного анализа, количество углерода и азота статистически значимо ($p < 0.005$)

увеличивается в ряду бессменный пар < залежь < озимая пшеница (рис. 1, I и II). Показано увеличение обеспеченности органического вещества азотом в ряду бессменный пар > бессменная озимая пшеница > залежь (уменьшение показателя C : N) в отношении средних и крупных агрегатов ($p < 0.10$) (рис. 1, III). Отмечается наличие в почвенных образцах статистически значимой сильной корреляции содержания C и N ($R = 0.98$, $p < 0.005$). При анализе агрегатных фракций максимальное содержание органического вещества было зафиксировано для мелких агрегатов почвы под бессменной озимой пшеницей (3.91%, $p = 0.0012$). Отмечалось статистически значимое увеличение показателя C : N в средних и крупных агрегатах бессменного пара по сравнению с мелкими агрегатами бессменного пара ($p < 0.036$), а также средними и крупными агрегатами залежи ($p < 0.016$) и мелкими агрегатами почвы под вариантом бессменной озимой пшеницы ($p < 0.02$).

Биомасса бактерий, архей и грибов на основании данных qPCR. Согласно данным двухфакторного анализа с использованием алгоритма General Linear Models, оба фактора – система земледелия и размер агрегатных фракций, оказались статистически значимыми предикторами доли бактериального, архейного и грибного компонентов микробного сообщества исследуемых почвенных образцов. Система земледелия объясняла 59% вариации в количестве бактериальных и 77% в содержании архейных рибосомальных оперонов, при этом размер агрегатных фракций объяснял меньшую долю вариации в количестве прокариотного компонента сообщества (31 и 63% соответственно). В отношении грибов наблюдалась обратная тенденция: большая часть дисперсии в доле грибных рибосомальных оперонов объяснялась размером агрегата (73%), нежели системой земледелия (56%).

Система земледелия оказалась также статистически значимым предиктором величины отношения грибной биомассы к бактериальной. 44% общей вариации данного показателя объяснялись фактором системы земледелия. Влияние размера агрегатных фракций оказалось статистически незначимым.

По данным Real-time ПЦР, максимальное количество прокариот было обнаружено в мелких агрегатах залежи (<0.25 мм) и агрегатах среднего агрономически ценного (2–5 мм) размера (количество клеток в 1 г почвы составляло 7.22×10^9 и 7.50×10^9 для бактерий и 1.28×10^9 и 7.63×10^8 для архей, соответственно, $p < 0.02$), при этом количество бактерий на порядок превышало количество архей. Отмечается также тенденция к уменьшению количества бактерий и архей в крупных агрегатах по сравнению с мелкими (рис. 2). Для всех

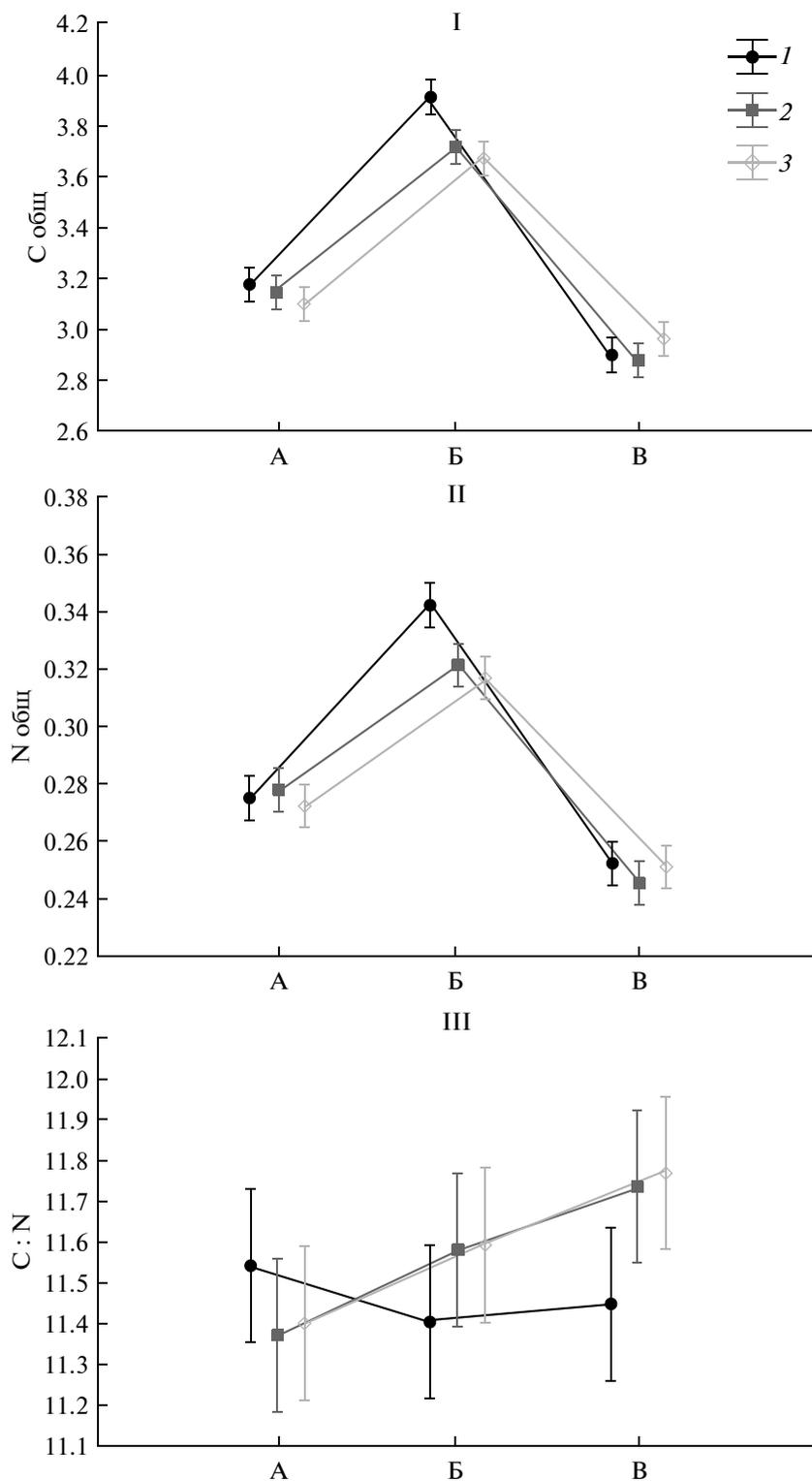


Рис. 1. Данные дисперсионного анализа содержания: общего углерода (I), общего азота (II), соотношения $C_{общ}/N_{общ}$ (III) в разных размерных группах почвенных агрегатов в условиях контрастных вариантов земледельческого использования. Условные обозначения здесь и далее: А – залежь, Б – бессменная озимая пшеница с 1964 г., В – бессменный пар с 1964 г.; агрегаты размером, мм: 1 – <0.25, 2 – 2–5; 3 – >7.

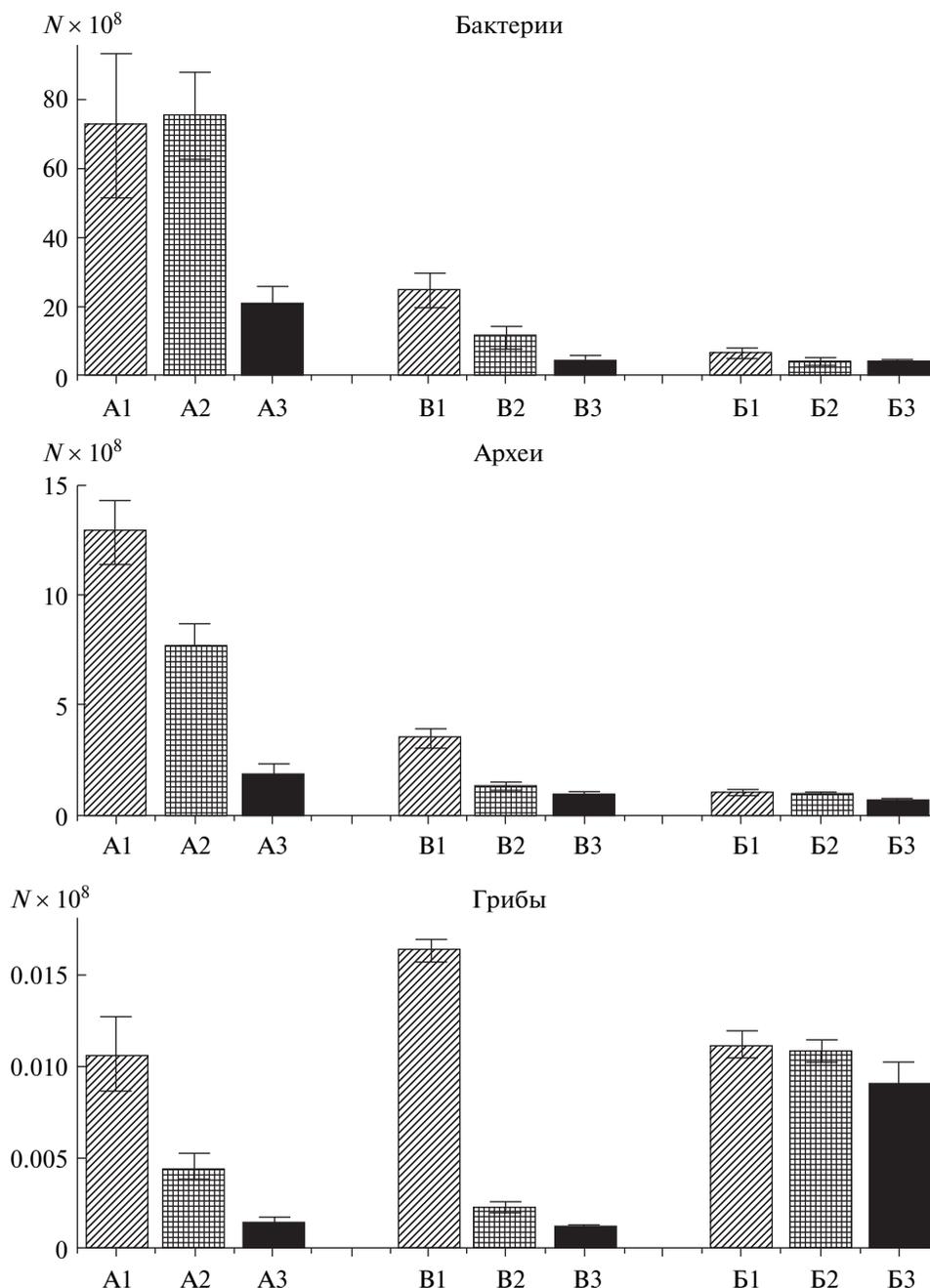


Рис. 2. Количество клеток бактерий, архей и грибов (количество клеток грибов представляет собой условную величину) в агрегатах различного размера в контрастных условиях землепользования по данным ПЦР в реальном времени. Условные обозначения здесь и далее: А1, А2, А3 – агрегаты почвы залежи размером <0.25, 2–5 и >7 мм соответственно; Б1, Б2, Б3 – агрегаты почвы варианта бессменной озимой пшеницы размером <0.25, 2–5 и >7 мм соответственно; В1, В2, В3 – агрегаты почвы бессменного пара размером <0.25, 2–5 и >7 мм соответственно.

исследуемых размерных групп агрегатов наблюдается общая тенденция к уменьшению прокариотного компонента в ряду залежь > пар > бессменная озимая пшеница.

Наибольшее количество грибов было отмечено в мелких агрегатах всех систем землепользования, при этом максимальная доля грибного ком-

понента зафиксирована в варианте бессменного пара (количество рибосомальных оперонов, пересчитанных на количество грибных клеток равно 1.0510^6 , $p < 10^{-4}$). Особенность длительного бессменного парования заключается в том, что почва постоянно находится в рыхлом состоянии при отсутствии растений. В таких условиях мик-

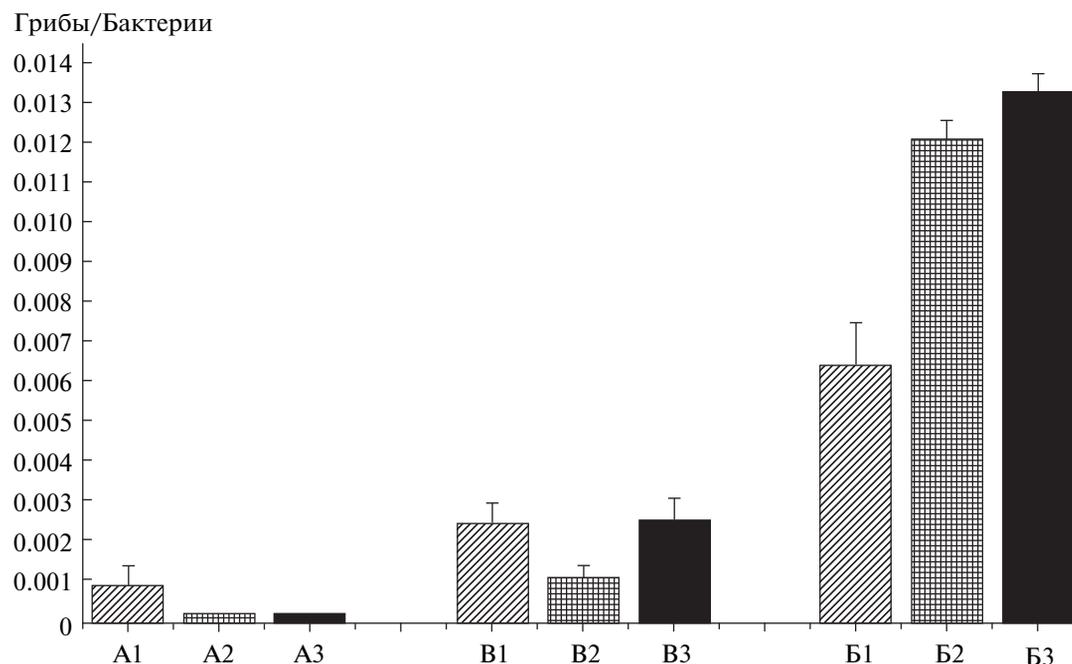


Рис. 3. Величина отношения грибной биомассы к бактериальной в разных размерных группах почвенных агрегатов в условиях контрастных типов землепользования.

робиологическая активность определяется главным образом аэрацией и минимизацией поступления органического вещества, что ведет к заметному уменьшению количества бактерий и увеличению доли грибов.

Отмечено также, что доля грибов в более крупных агрегатах почвы под бессменной озимой пшеницей в целом больше, чем в вариантах залежи и бессменного пара. Последнее может быть связано с поступлением большого количества растительных остатков и особенно соломы после уборки урожая, что ведет к увеличению численности целлюлозолитического комплекса почвенных микроорганизмов, главным образом микромицетов.

Максимальное значение отношения грибной биомассы к бактериальной зафиксировано в средних и крупных агрегатах варианта с бессменной озимой пшеницей по сравнению с другими вариантами землепользования ($p < 0.04$). Также во всех агрегатных фракциях наблюдается слабо выраженная тенденция к увеличению величины данного показателя в ряду залежь < пар < озимая пшеница (рис. 3).

Отмечена положительная корреляция отношения грибной биомассы к бактериальной с содержанием общего углерода и общего азота. По данным регрессионного анализа, количество общего углерода объясняло 52% вариации ($p < 0.03$). Статистически значимой корреляции бактериальной и археотной биомассы с количеством общего углерода и азота, а также показателем отношения об-

щего углерода к азоту, в исследуемых вариантах не наблюдалось. Недавними исследованиями показано, что количество лабильных фракций органического вещества в почвенных образцах многолетней залежи статистически значимо превышает таковое в бессменном пару и почве под бессменной озимой пшеницей [5]. По-видимому, количество бактериальной биомассы и таксономическая структура микробиомов черноземных почв обусловлена не столько количеством, сколько качеством органического вещества, в частности, количеством его лабильных (в том числе биоразлагаемых) компонентов.

Анализ данных секвенирования и таксономического состава микробиомов исследуемых почвенных образцов. В ходе исследования было получено 80206 качественных сиквенсов V4-вариабельного участка гена 16S рРНК, сформированных, по данным анализа ампликонных библиотек, в 2567 уникальных ОТЕ. До уровня домена было идентифицировано 99.7% всех сиквенсов, до уровня фил – 99.5%.

Различия в таксономической структуре микробиомов исследуемых систем землепользования. Доминирующими филами (количество составляло более 5% от числа всех сиквенсов) в микробном сообществе чернозема в условиях рассматриваемых типов землепользования были *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi*, при этом около 70% всех сиквенсов было представлено филами *Actinobacteria* и *Proteobacteria*.

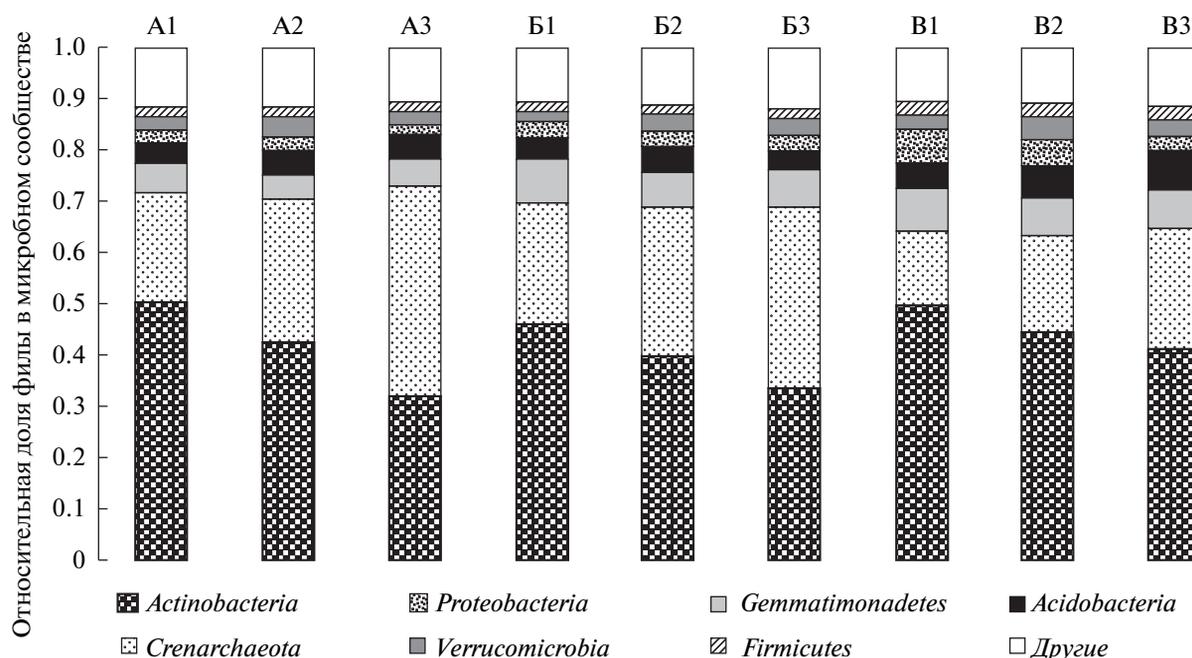


Рис. 4. Таксономическая структура микробного сообщества агрегатов различного размера чернозема типичного в контрастных системах земледелия на уровне фил.

Отмечено, что представители филы *Firmicutes* были ассоциированы главным образом с бесменным парованием почвы: содержание данной филы в варианте бесменного пара было достоверно максимальным (3.6%) по сравнению с почвой залежи (2.2%; $p = 0.008$) и вариантом с бесменной озимой пшеницей (2.3%, $p < 10^{-3}$). В почве бесменного пара зафиксирован достоверный максимум в содержании доли архей филы *Crenarchaeota* (5.0%), а также представителей филы *Gemmatimonadetes* (7.0% по сравнению с вариантом бесменной озимой пшеницы (6.5%) и залежи (4.3%)). Показано, что при переходе от бесменного пара к залежи и варианту с бесменным выращиванием озимой пшеницы в почве возрастает количество протеобактерий (20.6% в почве пара, 26.5 и 29.2% в почвах залежи и бесменной пшеницы соответственно) и уменьшается количество акцидобактерий (5.4, 4.4 и 3.7% соответственно) (рис. 4).

Анализ, проведенный посредством метода главных компонент, подтверждает положительную корреляцию бесменного парования с увеличением в почве бактерий фил *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* и *Crenarchaeota* (рис. 5). Полученные оси главных компонент объясняли в целом 96.4% вариации в долях рассматриваемых бактериальных фил ($p < 0.001$). На сегодняшний день сведений об экологических особенностях и предпочтениях бактерий филы *Acidobacteria* еще недостаточно, чтобы в полной мере оценить роль данной группы в наземных экосистемах. Известно лишь, что данная группа является обязатель-

ным компонентом сообщества почвенных микроорганизмов, в том числе почв сельскохозяйственного назначения; есть данные о том, что большинство бактерий филы *Acidobacteria* характеризуются олиготрофным типом питания [25]. Также имеются данные о том, что бесменное парование чернозема вызывает в определенной степени подкисление почвы [8], что, в свою очередь, создает благоприятную среду для акцидобактерий. Представители филы *Firmicutes* способны переживать неблагоприятные условия благодаря способности к формированию эндоспор (*Bacillus*), что, возможно, позволяет им сохраняться в условиях низкой питательной ценности субстрата, какими являются почвы бесменного пара. Бактерии филы *Gemmatimonadetes* отличаются высокой устойчивостью к низкому давлению почвенной влаги и обнаруживаются в большом количестве в гипераридных районах [15].

Отмечено достоверное увеличение численности умеренно ацидофильных гетеротрофных акцидобактерий семейства *Solibacteraceae* в варианте бесменного пара (2%) по сравнению с вариантом с бесменной озимой пшеницей (0.9%, $p < 10^{-5}$) и залежью (0.5%, $p < 10^{-6}$) (рис. 6). Бактерии рода *Solibacter*, помимо олиготрофного типа питания [18], известны также своей устойчивостью к стрессовым воздействиям окружающей среды (низкой влажности) благодаря способности к формированию биопленок. Кроме того, в варианте бесменного пара зафиксирован максимум в содержании бактерий порядка *Bacillaceae* (pp. *Bacillus* (2.1%, $p < 0.002$) и *Paenibacillus* (0.28%, и $p <$

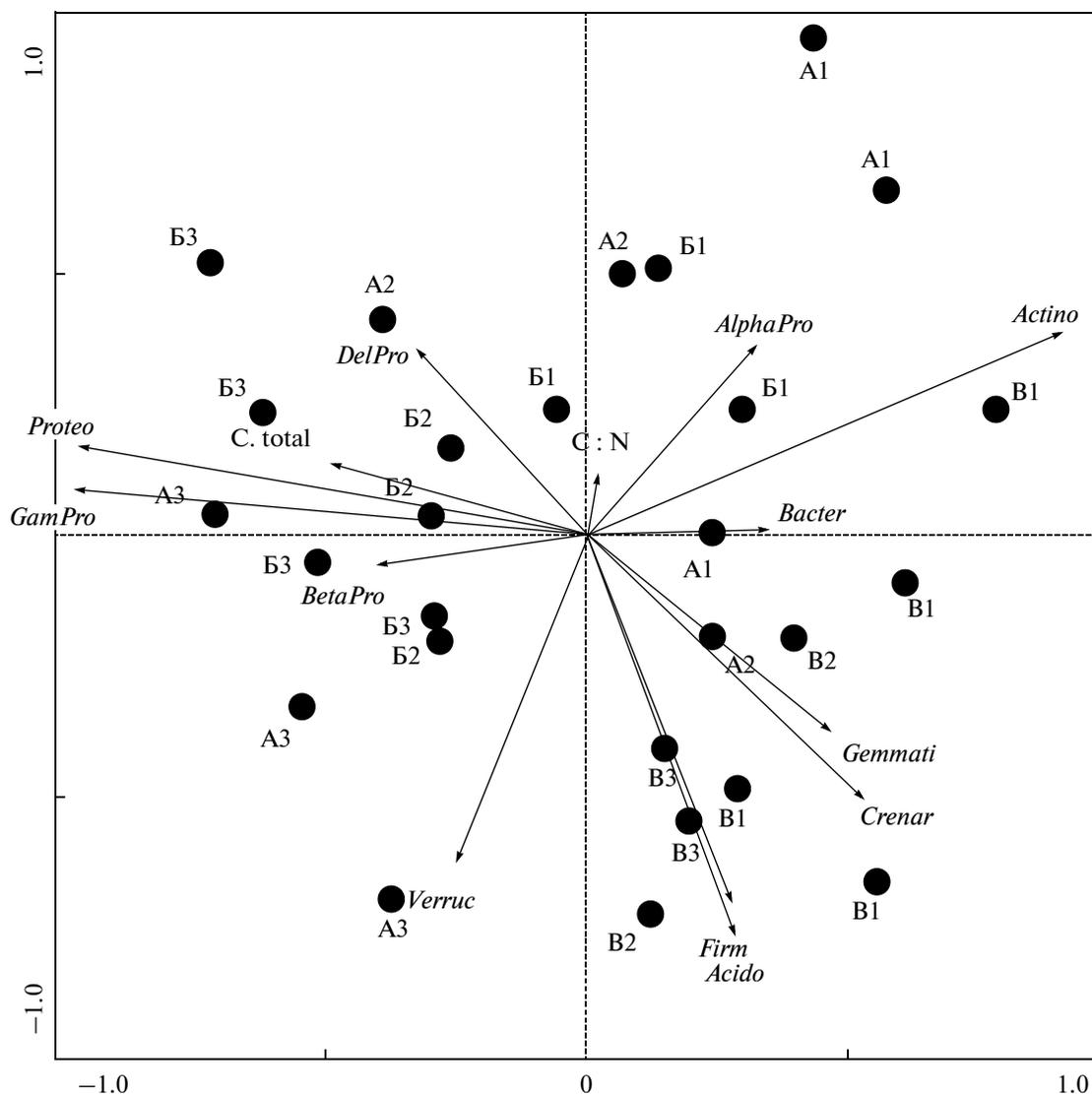


Рис. 5. Анализ микробиомов на уровне фил (для анализа были рассмотрены только филы, доля которых в микробном сообществе превышала 5%) и классов протеобактерий методом главных компонент.

< 0.034) и минимумы в содержании ризосферных бактерий родов *Mycobacterium* (0.11%, $p < 0.007$) и *Pseudomonas* (2.3%, $p < 0.034$).

Показано, что в почвах залежи значительно увеличивается количество бактерий порядков *Micrococcales* (2.7%, по сравнению с вариантом бессменного пара (138%, $p = 0.001$) и бессменной озимой пшеницы (129%, $p = 0.001$) и *Acidimicrobiales* (145%, по сравнению с вариантом бессменного пара (031%, $p = 0.001$) и бессменной озимой пшеницы (062%, $p = 0.002$). Из литературы известно, что выращивание люцерны на аридных почвах, до этого занятых нативной кустарниковой растительностью, приводило к увеличению доли бактерий порядка *Acidimicrobiales* [16]; есть также данные о том, что количество ОТЕ, относимых к данному порядку, было больше в естественных лесах, нежели в почвах пастбищ, образованных благодаря сведе-

нию реликтового леса [33]. Таким образом, увеличение доли порядка *Acidimicrobiales* может играть роль индикатора восстановления почвы и возвращения ее естественного плодородия.

В почвенных образцах залежи зафиксирован достоверный минимум в содержании хемоорганотрофных бактерий семейства *Conexibacteriaceae* (0.53%, $p < 0.001$). Одновременно в варианте залежи обнаруживалось достоверно максимальное значение в доле бактерий родов *Agromyces* (0.41%, $p < 0.0001$), *Pedomicrobium* (0.31%, $p < 0.0001$) и *Steroidobacter* (0.31%, $p < 0.02$). Семейства *Conexibacteriaceae* совместно с семействами *Solirubrobacteriaceae* и *Patulibacteraceae* составляют порядок *Solirubrobacterales*. Представителей порядка *Solirubrobacterales* обнаруживали в почвах пастбищ; данные бактерии могут выступать в роли возможных индикаторов нарушенных ме-

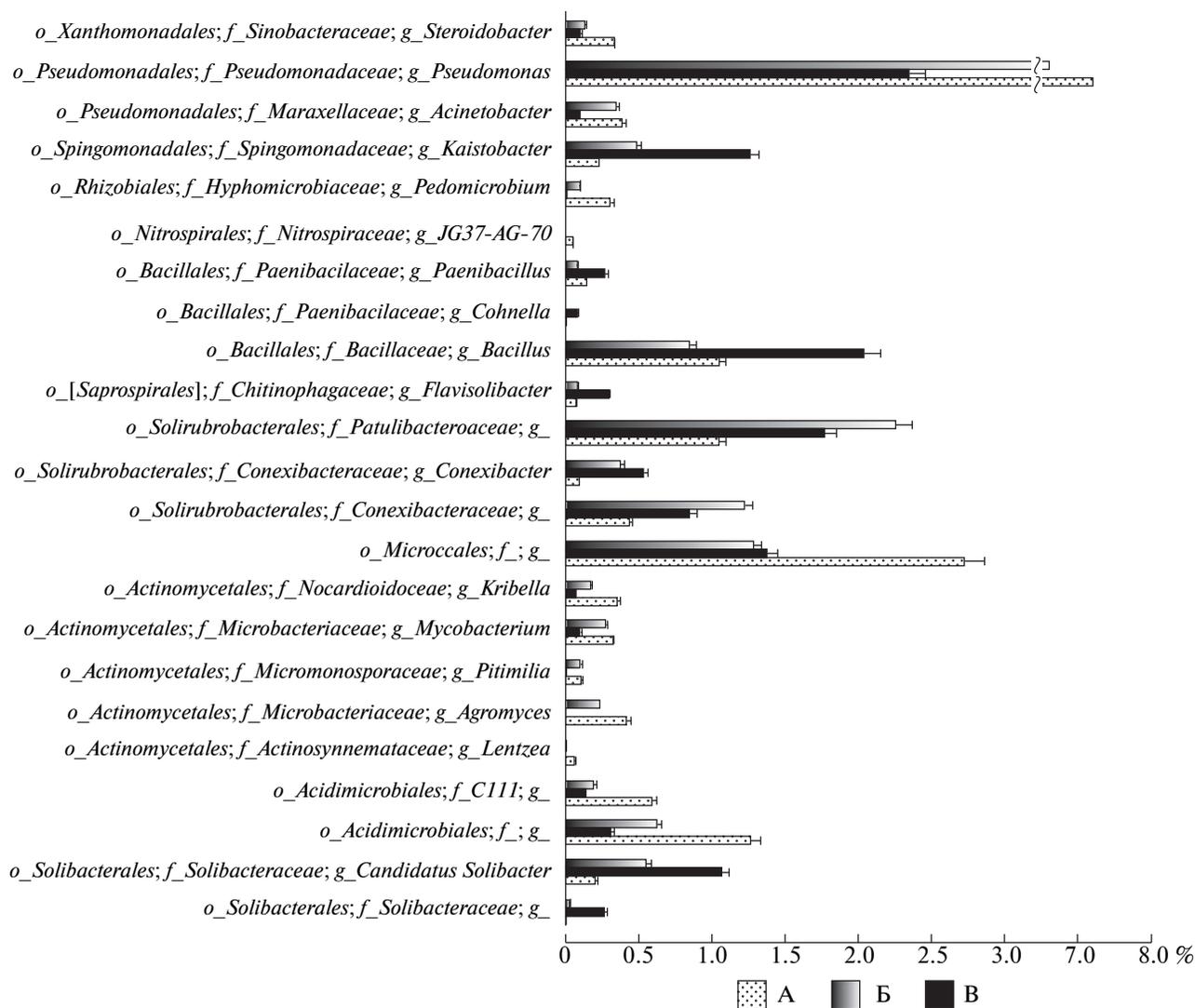


Рис. 6. Таксоны, доля которых отличается, согласно критерию Манна–Уитни, между микробиомами чернозема в рассматриваемых системах землепользования. Здесь и далее: o (order) – порядок, f (family) – семейство, g (genus) – род.

стообитаний. Одновременно в почве залежи отмечено достоверное увеличение доли бактерий р. *Agromyces*. Род *Agromyces* к настоящему моменту представлен 24 видами, основным местообитанием которых является почва: в качестве источников могут быть плодородные почвы лугов, а также ризосфера и такни растений [34]. Бактерии р. *Agromyces* могут принимать участие в круговороте углерода, а также прямо или косвенно вносить вклад в обеспечение роста растений [11].

Показано, что образцы залежи и почвы при выращивании бессменной озимой пшеницы характеризовались достоверно большим количеством филотипов *Proteobacteria* ($p < 0.05$), что может быть связано с тем, что большая часть бактерий, входящих в ее состав, являются типичными обитателями ризосферы.

Анализ микробиомов различных агрегатных фракций. Отмечен ряд отличий в структуре микробиомов различных агрегатных фракций. Количество актинобактерий увеличивалось в мелких агрегатах (49.6%) по сравнению со средними (42.5%, $p = 0.03$) и крупными (37.5%, $p < 10^{-3}$) агрегатными фракциями (рис. 7). Также отмечалась тенденция к уменьшению содержания актинобактерий при переходе от средних агрегатов к крупным ($p = 0.07$). Достоверно максимальное содержание протеобактерий, напротив, отмечалось в крупных агрегатах (>7 мм) (31.6% по сравнению с 26.1% (средние агрегаты) ($p < 0.05$) и 20.3% (мелкие структурные отдельности) ($p < 0.001$). Данное утверждение, однако, справедливо лишь для γ - и δ -протеобактерий, в то время как содержание α -протеобактерий положительно коррелировало в большей степени с мелким раз-

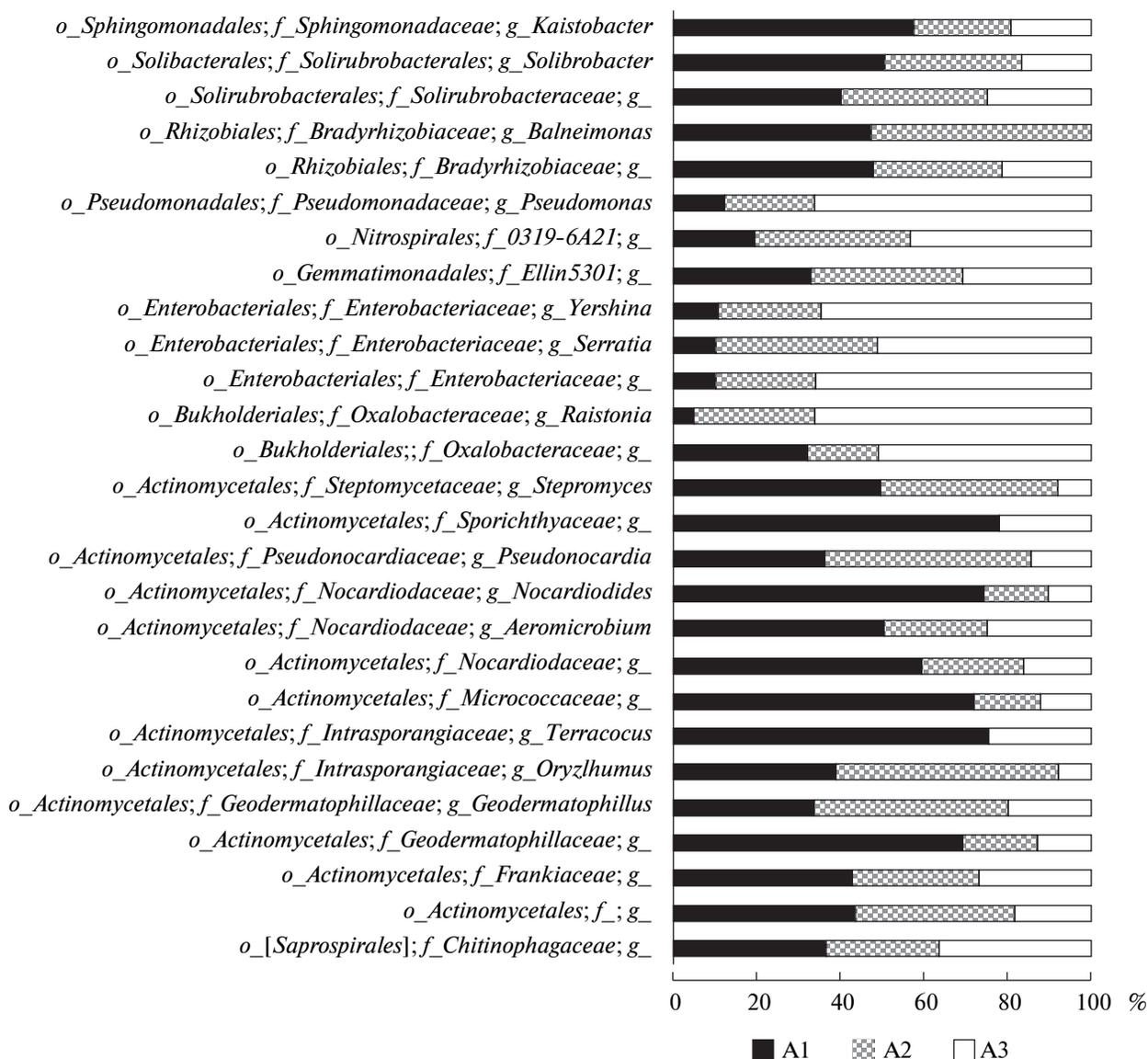


Рис. 7. Таксоны, доля которых отличается, согласно критерию Манна–Уитни, между микробиомами исследуемых агрегатных фракций чернозема. Представлены относительные количества конкретных таксонов при условии, что суммарное количество данного таксона во всех исследуемых агрегатных фракциях составляет 100%.

мером агрегатных фракций. Положительная корреляция доли бактерий филы *Proteobacteria* с размером почвенных структурных отдельных частей — это известный в литературе факт [30]. Приуроченность актинобактерий к мелким агрегатным фракциям связана, скорее всего, с преимущественным олиготрофным характером большей части представителей данной филы, а также с миецелиальным типом строения многих актинобактерий.

В мелких агрегатных фракциях, по сравнению с крупными, увеличивалась доля актинобактерий семейств *Frankiaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Nocardiodaceae*, *Micrococcaceae*, *Sporichthyaceae*, *Solirubrobacteraceae*, *Chitinophagaceae*, а также рр. *Strepto-*

myces и *Oryzihumus*. При этом доля актинобактерий семейств *Nocardiodaceae* и *Solirubrobacteraceae* статистически значимо уменьшалась в ряду мелкие > средние > крупные агрегаты ($p = 0.012$ и $p < 0.006$ соответственно). Одновременно доли протеобактерий семейств *Enterobacteraceae* (не идентифицированных до уровня рода) и *Pseudomonadaceae* (р. *Pseudomonas*) статистически значимо увеличивалась от мелких структурных отдельных частей (3.0 и 1.8%) к средним (7.3 и 4.0%) и достигали максимума в крупных агрегатах (10.0 и 7.3%, $p = 0.027$ и $p < 0.038$ соответственно).

Анализ биоразнообразия прокариотного сообщества исследуемых образцов. Холистический подход к анализу

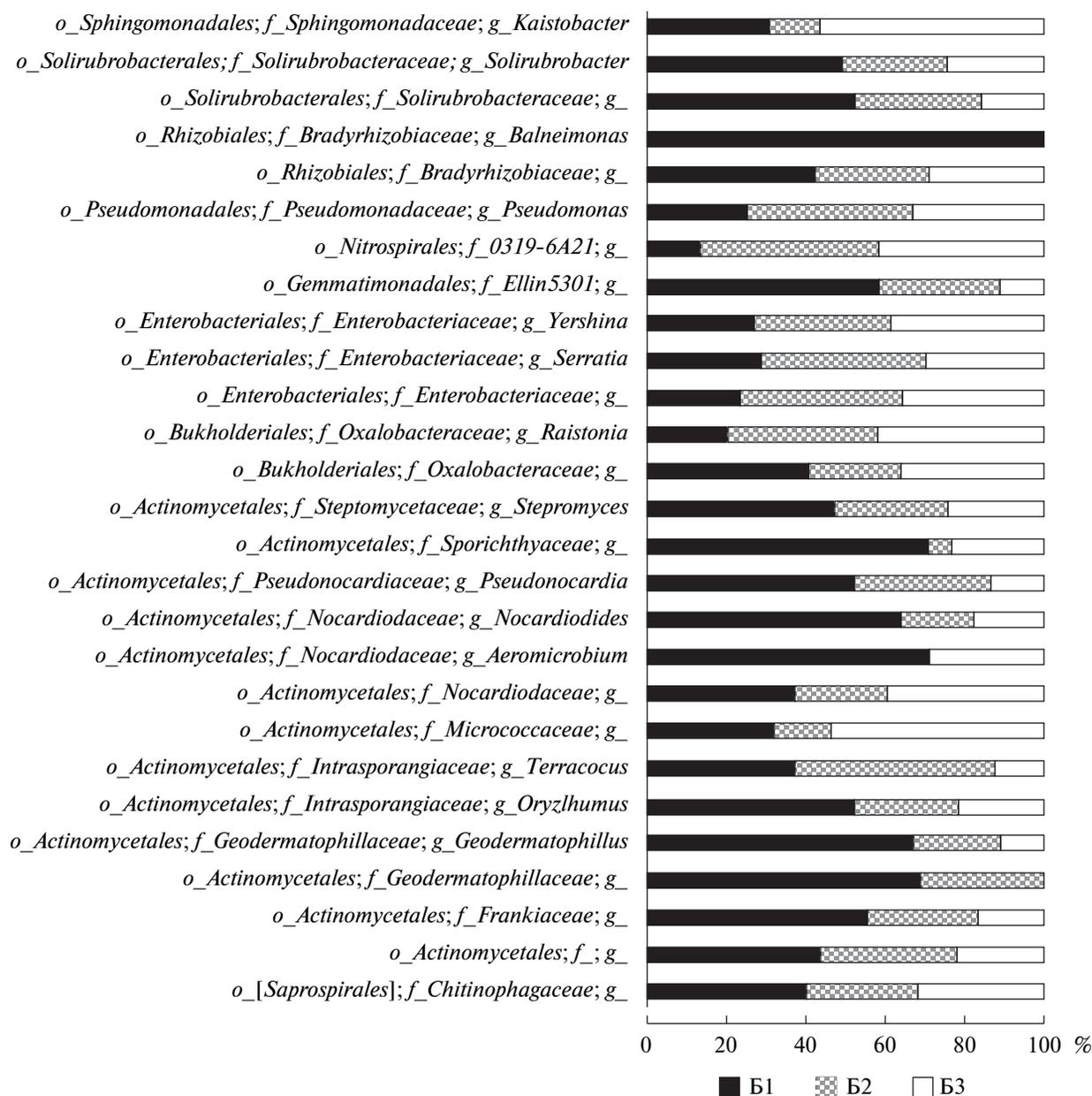


Рис. 7. (Продолжение.)

биоразнообразие включает в себя оценку интегральных характеристик сообщества (например, показателей “richness” — видового богатства и “evenness” — выровненности разнообразия) (альфа-разнообразие) и сравнительный анализ микробиомов (с использованием разнообразных методов многомерной статистики, в частности, кластерного анализа) (бета-разнообразие). При этом показатели богатства видами отдельных сообществ входят в понятие альфа-разнообразия, в то время как изменчивость показателей альфа-разнообразия в пространстве, в частности, при переходе одного сообщества к другому, характеризуется в рамках анализа бета-разнообразия.

Анализ альфа-разнообразия. Наибольшим биологическим разнообразием отличались варианты мелких и средних агрегатов залежи по сравнению с вариантами бессменного пара и бессменной озимой пшеницы (табл. 2). Во всех системах земледелия отмечалось также уменьшение биоразнообразия при переходе от мелких агрегатов (<0.25 мм) к крупным структурным отдельностям (>7 мм).

В отношении таких показателей, как “richness” и “evenness” (количество наблюдаемых видов, индекс Шеннона и Shannon_evenness), существенную роль играет система земледелия

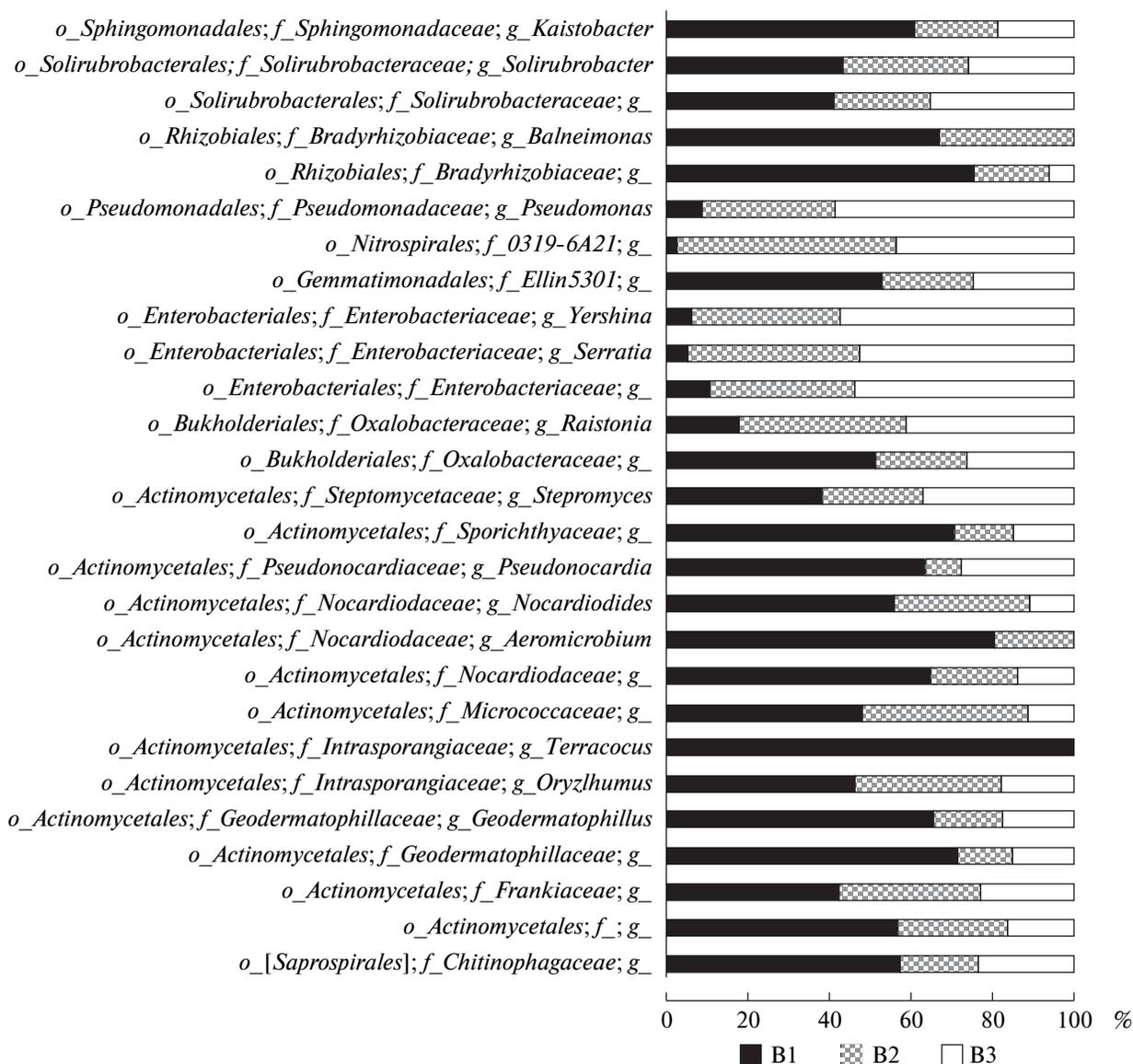


Рис. 7. (Окончание.)

(процент вариации в значениях вышеупомянутых индексов, объясненной действием фактора системы землепользования, составляет 84, 82 и 81% соответственно), в то время как значения показателей “richness”, учитываемого в индексе Chao1, а также филогенетическое разнообразие микробиомов (PD) в большей степени объясняется действием фактора размера агрегатных фракций (фактор размера объясняет 50.1% вариации в значении индекса Chao1 и 41% – индекса PD. Достоверные максимумы значения показателя “выровненности” микробного сообщества (индекс Shannon-evenness) зафиксированы в мелких и средних агрегатах залежной почвы (по сравнению со всеми агрегатными фракциями вариантов бессменного пара и озимой пшеницы), что свидетель-

ствует о большей стабильности (более высокой “буферности”) и адаптивном потенциале микробного сообщества данных вариантов по сравнению с остальными.

В целом образцы залежной почвы демонстрировали наиболее высокие уровни биоразнообразия: в почве залежи достоверно увеличивалось значение индексов Шеннона и Shannon-evenness ($p > 0.05$), кроме того, в данном варианте зафиксирован статистически достоверный максимум индекса филогенетического разнообразия (PD) по сравнению с вариантами бессменного пара и выращиванием озимой пшеницы. Также отмечалась тенденция к уменьшению показателя “выровненности” (согласно значениям Shannon_evenness) при переходе от бессменного парования к вариан-

Таблица 2. Показатели биоразнообразия для 2200 случайных последовательностей (сиквенсов) исследуемых почвенных образцов

Образец, фракция, мм	Количество (среднее) сиквенсов	Филогенетическое разнообразие	Чао1 (Chao1)	Количество видов (OTE)	Индекс Шеннона	Индекс выровненности Шеннона
Залежь						
<0.25	2227	58.91	1482.77	785.4	8.72	3.12
2–5	2206	58.23	1350.30	763.1	8.58	3.10
>7	2325	54.10	1114.53	680.2	8.29	3.05
Бессменный пар с 1964 г.						
<0.25	2467	52.67	1327.93	664.4	8.17	3.03
2–5	3136	52.68	1363.34	634.8	8.03	3.00
>7	3394	51.77	1131.48	614.2	7.95	2.99
Бессменная озимая пшеница с 1964 г.						
<0.25	4118	55.14	1334.52	676.2	8.12	3.02
2–5	4689	53.43	1150.69	628.8	7.81	2.96
>7	3664	48.41	945.06	563.9	7.40	2.89

ту с бессменным выращиванием озимой пшеницы ($p = 0.08$). Достоверный минимум значения индекса Чао1 зафиксирован в случае крупного размера агрегатных фракций, отличия между размерными группами 2–5 и <0.25 мм были статистически незначимы.

По-видимому, причинами относительно низкого уровня биоразнообразия прокариот в крупных агрегатах по сравнению с более мелкими размерными фракциями может быть выедание микроорганизмов почвенными беспозвоночными наряду с уменьшением количества доступных элементов минерального питания [30]. С другой стороны, возможной причиной снижения бактериального разнообразия в крупных структурных отдельностях может быть наличие большего количества связанных пор, так как известно, что биоразнообразие увеличивается в случае уменьшения связанного порового пространства вследствие увеличения количества микрониз с различными экологическими условиями. Возможно также, наличие связанных крупных пор является причиной более низких уровней видовой насыщенности почв бессменного пара и варианта с выращиванием озимой пшеницы, так как известно, что вовлечение почвы в сельскохозяйственный оборот ведет к уменьшению текстурной пористости и увеличению межагрегатной пористости, то есть увеличению связанного порового пространства.

Анализ бета-разнообразия. Анализ, проведенный методом “невзвешенного” Unifrac, демонстрирует кластеризацию микробного сообщества согласно типу землепользования, в то время как размер структурных не оказывает столь существенного влияния на видовое разнообразие микробиомов исследуемых почв. При анализе микробиомов методом “взвешенного” Unifrac наблюдается четкая кластеризация агрегатов зале-

жи, при этом агрегаты вариантов бессменного пара и почвы с бессменным выращиванием озимой пшеницы оказываются перемешанными между собой. Также в данном варианте отмечается кластеризация микробных сообществ мелких структурных отдельностей почвы во всех исследуемых вариантах землепользования, что может свидетельствовать о сходном видовом составе микробиомов данных вариантов. В обоих методах отмечалось “выпадение” некоторых повторностей, относящихся к крупным агрегатам (>7 мм) почвы под бессменной озимой пшеницей и залежной почвы, что может быть следствием большей гетерогенности, обусловленной наличием большого количества связанных воздушных пор в крупных структурных отдельностях по сравнению с более мелкими размерными группами (рис. 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Почвенная микробиота – чувствительный индикатор последствий разного рода антропогенных воздействий на почву. Вовлечение почвы в сельскохозяйственный оборот и научно необоснованная антропогенная нагрузка приводят к изменению ряда физико-химических параметров почвы (водного, воздушного режима и химического состава, pH и др.). В результате трансформируются условия существования почвенного микробного комплекса, что, в свою очередь, сопровождается перестройкой его структуры: изменением видового состава, сменой доминант, происходит смещение аэробно-анаэробного равновесия и изменение направленности и интенсивности микробиологических процессов.

В проведенном исследовании показано, что система землепользования является существенным фактором, определяющим таксономическую структуру микробного сообщества. Установлено, что длительное воздействие, сопровож-

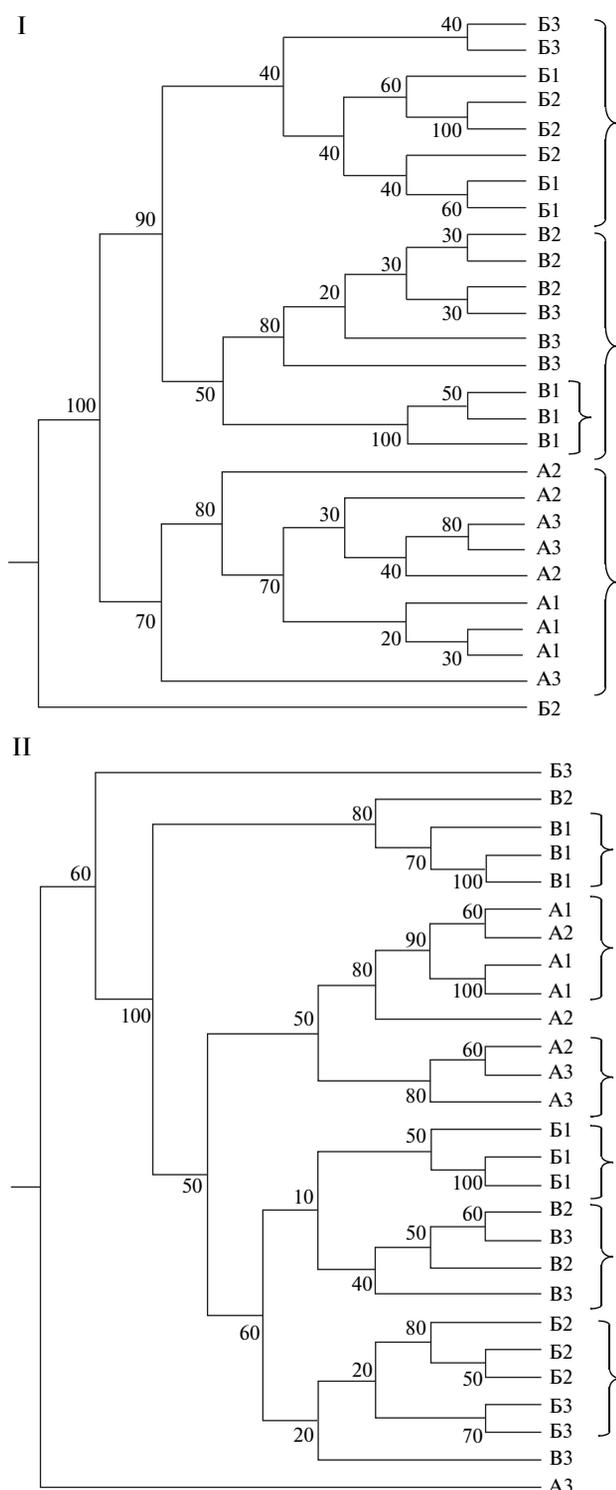


Рис. 8. Кластерный анализ, проведенный на основании матрицы генетических дистанций, полученных методом “невзвешенного” (unweighted) (I) и “взвешенного” (weighted) (II) Unifrac с использованием алгоритма “джекнайф”.

даемое бессменным парованием почвы или же бессменным выращиванием сельскохозяйственных культур, ведет к существенному снижению биоразнообразия и значительной перестройке структуры микробиоценоза; последствия данного воздействия зависят от его типа. Показано, что бессменное парование положительно коррелировало с увеличением доли в сообществе бактериальных фил: *Acidobacteria*, *Firmicutes* и *Gemmatimonadetes*, в то время как в почвах залежи и варианте с бессменным выращиванием озимой пшеницы наблюдалось увеличение доли ризосферных бактерий филы *Proteobacteria*.

При изучении микробиомов агрегатов различного размера в разных условиях землепользования были отмечены следующие закономерности:

1. Наибольшим разнообразием, согласно индексам Шеннона и выровненности Шеннона, а также филогенетическим разнообразием, отличались агрегаты залежи, главным образом, мелкого и среднего размера.

2. Наибольшее количество прокариотов было отмечено в мелких и средних агрегатах залежи, при этом биомасса бактерий и архей уменьшалась в ряду залежь > бессменный пар > бессменная озимая пшеница. Грибная биомасса была приурочена, с одной стороны, к мелким размерным фракциям (максимум был обнаружен во фракции <0.25 мм бессменного пара), с другой — наблюдалось увеличение количества грибов в варианте бессменной пшеницы.

3. В образцах всех систем землепользования отмечалось снижение биоразнообразия прокариотного сообщества при переходе от мелких размерных фракций к агрегатам крупного размера, что может быть обусловлено, с одной стороны, конкуренцией с эукариотными организмами, а с другой — наличием крупных пор и связанного порового пространства.

Авторы выражают *благодарность* Л.Г. Маркиной, выполнившей анализы содержания общего углерода и азота в структурных отдельностях исследуемых почвенных образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды / Ред. А.А. Белимов. С.-Пб, 2011. 23 с.
2. Василенко Е.С., Кутовая О.В., Тхакахова А.К., Мартынов А.С. Изменение численности микроорганизмов в зависимости от величины агрегатов гумусового горизонта миграционно-мицелярного чернозема // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2014. Т. 73. С. 150–173.
3. Вершинин П.В. Почвенная структура и условия ее формирования. М.: Московский рабочий, 1981. 88 с.

4. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2005. 445 с.
5. Козут Б.М., Сысуев С.А., Холодов В.А. Водопрочность и лабильные гумусовые вещества типичного чернозема при разном земледельческом использовании // Почвоведение. 2012. № 5. С. 555–561.
6. Романычева А.А., Селиверстова О.М., Верховцева Н.В., Милановский Е.Ю. Сравнительный анализ структуры микробного сообщества и количества водопрочных агрегатов чернозема выщелоченного // Проблемы агрохимии и экологии. 2013. № 3. С. 30–34.
7. Холодов В.А. Способность почвенных частиц самопроизвольно образовывать макроагрегаты после цикла увлажнения и высушивания // Почвоведение. 2013. № 6. С. 698–706.
8. Чесняк Г.Я., Чесняк О.А. Влияние сельскохозяйственных культур на кислотность почвенного раствора чернозема мощного Левобережной лесостепи УССР // Тр. Харьков. СХИ. 1972. Т. 181. С. 36–42.
9. Шейн Е.В., Милановский Е.Ю. Роль и значение органического вещества в образовании и устойчивости почвенных агрегатов // Почвоведение. 2003. № 1. С. 53–61.
10. Bates S.T., Berg-Lyons J.G., Caporaso W.A. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // ISME J. 2010. № 5. P. 908–917.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds: M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M.E. Trujillo, K.-I. Suzuki, W. Ludwig, W.B. Whitman. The *Actinobacteria*. 2012. V. 5. P. 1–2.
12. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature Methods. 2010. V. 5. № 7. P. 335–336.
13. Carson J.K., Gonzalez-Quinones V., Murphy D.V., Hinz C., Shaw J.A., Gleason D.B. Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil // Appl. Environ. Microb. 2010. № 76. P. 3936–3942.
14. Davinic M., Fultz L.M., Acosta-Martinez V., Calderón F.J., Cox S.B., Dowd S.E., Allen V.G., Zak J.C., Moore-Kucera J. Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition // Soil Biol. Biochem. 2012. № 46. P. 63–72.
15. DeBruyn J.M., Nixon L.T., Fawaz M.N., Johnson A.M., Radosevich M. Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of *Gemmatimonadetes* in Soil // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 17. P. 6295–6300.
16. Ding G.-C., Piceno Y.M., Heuer H., Weinert N., Dohrmann A.B. et al. Changes of Soil Bacterial Diversity as a Consequence of Agricultural Land Use in a Semi-Arid Ecosystem // PLoS One. 2013. V. 8. Iss. 3. P. 1–14.
17. Elliott E.T. Aggregate Structure and Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in Native and Cultivated Soils // Soil Sci. Soc. Am. J. 1986. V. 50. P. 627–633.
18. Fierer N., Bradford M.A., Jackson R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria // Ecology. 2007. V. 6. № 88. P. 1354–1364.
19. Fierer N., Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities // PNAS. 2006. V. 103. № 3. P. 626–631.
20. Ganley A., Kobayashi T. Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data // Genome Res. 2007. № 17. P. 184–191.
21. Garber R.C., Turgeon B.G., Selker E.U., Yoder O.C. Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus* // Current Genetics. 1988. V. 14. № 6. P. 573–582.
22. Jastrow J.D. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter // Soil Biol. Biochem. 1996. V. 28. Iss. 4–5. P. 665–676.
23. Jurgens G., Saano A. Diversity of soil archaea in boreal forest before and after clear-cutting and prescribed burning // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. V. 29. P. 205–213.
24. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing / Eds: E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 1991. P. 115–175.
25. Lee S.-H., Ka J.-Ok., Cho J.-C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil // FEMS Microbiol. Lett. V. 285. 2008. P. 263–269.
26. Moskalenko S.E., Chabelskaya S.V., Inge-Vechtomov S.G., Philippe M., Zhouravleva G.A. Viable nonsense mutants for the essential gene SUP45 of *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Molecular Biology. 2003. V. 4. Iss. 2. P. 1–14.
27. Mummey D., Holben W., Six J., Stahl P. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils // Microbial Ecol. 2006. № 51. P. 404–411.
28. Mummey D.L., Stahl P.D. Analysis of soil whole- and inner-microaggregate bacterial communities // Microbial Ecol. 2004. № 48. P. 41–50.
29. Puget P., Chenu C., Balesdent J. Total and young organic matter distributions in aggregates of silty cultivated soils // Eur. J. Soil Sci. 1995. V. 46. P. 449–459.
30. Sessitsch A., Weilharter A., Gerzabek M.H., Kirchmann H., Kandeler E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4215–4224.
31. Six J., Bossuyt H., Degryze S., Denef K. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics // Soil Tillage Research. 2004. V. 79. P. 7–31.
32. Six J., Paustian K., Elliott E.T., Combrink C. Soil structure and soil organic matter: I. Distribution of aggregate size classes and aggregate associated carbon // Soil Sci. Soc. Am. J. 2000. V. 64. P. 681–689.
33. Suleiman A.K., Manoeli L., Boldo J.T., Pereira M.G., Roesch L.F. Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change // Syst. Appl. Microbiol. 2013. V. 36. Iss. 2. P. 137–144.
34. Takeuchi M., Hatano K. *Agromyces luteolus* sp. nov., *Agromyces rhizosphaerae* sp. and *Agromyces brachium* sp. nov., from the mangrove rhizosphere // J. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 1529–1537.
35. Van Veen J.A., Kuikman P.J. Soil structural aspects of decomposition of organic matter by microorganisms // Biogeochemistry. 1990. V. 11. Iss. 3. P. 213–233.
36. Yu Y., Lee Ch., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // Biotechnology and Bioengineering. 2005. V. 89. № 6. P. 670–679.