

ВЛИЯНИЕ ЛАНТАНА НА СОСТАВ МЕТАНОТРОФНОГО СООБЩЕСТВА ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ

© 2022 г. И. К. Кравченко^а*, Л. Р. Сизов^б, Е. Н. Тихонова^а, Л. В. Лысак^с

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^бИнститут проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119192 Россия

*e-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 20.05.2022 г.

Лантан регулирует метаболизм микроорганизмов, использующих одноуглеродные соединения, однако сведения о его воздействии на почвенные сообщества практически отсутствуют. Впервые методом высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК в экспериментах с почвенными микрокосмами изучен ответ метанотрофных сообществ на внесение лантана. Установлено, что внесение солей лантана через один и два месяца увеличивает долю *Methylobacter* в общем пуле последовательностей до 9 и 15% соответственно. Одновременно наблюдается возрастание содержания метилотрофа *Methylothera* до 10 и 19%. Таким образом, лантан стимулирует формирование комплексов *Methylobacter–Methylothera* в условиях повышенного содержания метана в почве, что может влиять на вклад сельскохозяйственных почв в регуляцию содержания метана в атмосфере.

Ключевые слова: агропочвы, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование 16S рРНК, *Methylobacter*, *Methylothera*

DOI: 10.31857/S0026365622100238

Метан является важным парниковым газом, и, несмотря на содержание в атмосфере менее 0.02%, его вклад в современное глобальное потепление оценивается в 15% (Saunio et al., 2020). Единственным известным биологическим способом поглощения метана из атмосферы Земли является его окисление микробными сообществами аэробных почв, поэтому любые изменения интенсивности этого процесса могут иметь глобальные последствия. Согласно современным расчетам, интенсивность поглощения метана почвенными микроорганизмами составляет 22.4 Тг год⁻¹, из которых половина приходится на почвы умеренной зоны (Dutaur, Verchot, 2007).

Почвы агроценозов находятся под постоянным воздействием различных соединений, поступающих с атмосферными осадками, удобрениями, выбросами предприятий и автотранспорта (Smith et al., 2016). Микробные сообщества почв отвечают за осуществление важнейших экосистемных процессов, что вызывает постоянно растущий интерес к изучению их устойчивости и восстановлению после стрессовых воздействий (Griffiths, Philippot, 2013). Сведения об изменении состава метанотрофных сообществ при внесении удобрений весьма огра-

ничены, и наиболее часто рассматриваются азотные соединения. О влиянии на микробные сообщества почв других элементов, например лантаноидов, известно очень мало.

Лантаноиды входят в группу редкоземельных элементов (РЗЭ), которые широко используются в современных технологиях (Водяницкий, Рогова, 2016). Основная часть лантаноидов, которые поступают в почву при разложении литогенных минералов, содержится в металлоорганических комплексах и недоступна для растений и микроорганизмов (Котельникова и соавт., 2021). В то же время лантаноиды, попадающие в почву в результате антропогенной активности (минеральные и органические удобрения, микроудобрения), находятся в биологически доступной форме и могут нарушить цикл РЗЭ в окружающей среде (Ramos et al., 2016). В последнее десятилетие большое внимание лантаноидам, особенно легким, уделяется в связи с их стимулирующим воздействием на рост растений (Котельникова и соавт., 2021), в то время как сведения о влиянии на почвенные микроорганизмы весьма ограничены. Так в течение ряда лет проводились систематические исследования влияния лантаноидов на нитрифицирующие и

аммонифицирующие микроорганизмы почв Бурятии (Чимитдоржиева, Абашеева, 2014).

Открытие лантаноид-зависимой метанолдегидрогеназы (XoxF-MDH) (Chistoserdova, 2016) продемонстрировало важную роль редкоземельных элементов в метаболизме метилотрофов. Легкие лантаноиды, особенно лантан (La), могут эффективно заменять кальций в метанолдегидрогеназе. Как результат, наличие лантаноидов даже в наномолярных количествах регулирует экспрессию генов синтеза альтернативной метанолдегидрогеназы и влияет на образование метанотрофами внеклеточного метанола, что может привести к изменениям в составе микроорганизмов-спутников (Krause et al., 2017). Это открывает перспективы для разработки новых подходов к регулированию состава и активности метанотрофов почвы и связанной с ними микробиоты. В то же время авторам не известны работы по оценке влияния лантана или других лантаноидов на метанотрофные сообщества почв.

Целью настоящего исследования было оценить влияние солей лантана на состав метанотрофных сообществ в экспериментах с почвенными микробиотами.

В ноябре 2020 г. была заложена серия экспериментов с дерново-подзолистой среднесуглинистой почвой поверхностного горизонта А (0–20 см) залежного разнотравно-злакового луга. Объект находится вблизи Пошехонской птицефабрики, Ярославская область (58°30'36" с.ш. и 39°08'32" в.д.), более 20 лет использовался в севообороте с внесением высоких доз органического удобрения. Почва умеренно кислая (рН 5.4), с высоким содержанием органического вещества ($C_{\text{орг}}$ по Тюрину 21.7 г кг⁻¹), высоким содержанием нитратов (261 мг кг⁻¹) и низким содержанием аммонийного азота (<5 мг кг⁻¹).

Исходная почва (вариант К) была использована для создания микрокосмов, каждый из которых представлял собой 10 г почвы естественной влажности, помещенной в стеклянный флакон объемом 100 мл. Флаконы содержали в эксикаторе с газовой смесью, состоящей из 10% метана и 90% воздуха для инкубации в течение 2 мес. при 25°C. Один раз в неделю проводили замену газовой фазы и контролировали влажность почвы гравиметрически. Были исследованы следующие варианты: М – без добавок; МL1 – внесение раствора хлорида лантана (5 мкг La³⁺), инкубация в течение 1 мес.; МL2 – внесение раствора хлорида лантана (5 мкг La³⁺), инкубация 2 мес. Для выделения ДНК и молекулярного анализа было использовано по два отдельных образца на вариант, итого 8 образцов.

Тотальную ДНК выделяли из 0.25 г почвы с использованием набора Power Soil DNA Isolation Kit ("Qiagen, Carlsbad", CA, США). Оценку состава

прокариотных сообществ почв с помощью высокопроизводительного секвенирования переменного региона V3–V4 гена 16S рРНК на секвенаторе MiSeq ("Illumina", США) и первичную программную обработку полученных последовательностей проводили в ООО "Биоспарк". Для каждого образца ДНК было создано две библиотеки. Анализ библиотек проводили методом парно-концевого чтения генерацией не менее 10000 парных прочтений на каждый образец с использованием следующих реактивов: MiSeq Reagent Kit v2 nano и MiSeq v2 Reagent Kit. Полученные данные секвенирования обрабатывали в программе, написанной с использованием алгоритма QIIME 1.9.1, включающего объединение прямых и обратных прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрации последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных нуклеотидов (качество менее Q30), фильтрации химерных последовательностей, выравнивание прочтений на референсную последовательность 16S рРНК. При расчете индексов разнообразия проводилась нормализация данных по образцу с минимальным количеством чтений. Распределение последовательностей по ОТЕ с использованием базы данных Silva версии 132 и расчет индексов разнообразия проводили в программе QIIME 2 (Caporaso et al., 2010). Использован алгоритм классификации ОТЕ с открытым референсом, порог классификации 97%.

Проведенный анализ показал, что доля последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов в исходной дерново-подзолистой почве составляла менее 0.1% от всех идентифицированных последовательностей. Были детектированы бактерии родов *Methylosinus* (0.05 ± 0.01%), *Methylocystis* (0.01 ± 0.006%), *Methylomonas* (0.004 ± 0.002%).

Инкубация микрокосмов с метаном, а также метаном и солями лантана снижала показатели разнообразия микробного сообщества (табл. 1), однако увеличивала долю метанотрофов и изменяла структуру метанотрофного сообщества. Через 30 сут инкубации с метаном количество *Methylosinus* возросло до 0.38 ± 0.08%. В составе сообщества были также обнаружены *Methylobacter* (2 ОТЕ, 0.43 ± 0.11%) и единичные последовательности *Methylocella* (0.03 ± 0.01%) (рис. 1), количество которых в исходной почве было ниже уровня детекции. Таким образом, количество метанотрофов через 1 мес. инкубации возросло на порядок и составило около 1% от общего числа последовательностей.

Внесение лантана принципиально изменяло количество и состав метанотрофов. Через 1 мес. доля последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов достигала 9.2%, из них *Methylobacter* составил 8.97 ± 0.9% (3 ОТЕ), а *Methylosinus* 0.10 ± 0.08% (рис. 1). Эффект влияния лантана был пролонги-

Таблица 1. Характеристики разнообразия микробных сообществ дерново-подзолистой почвы и почв инкубационного эксперимента

Образец	Характеристики библиотек фрагментов 16S рРНК		Количество ОТЕ	Количество родов (филумов)	Индексы разнообразия				
	количество последовательностей	количество нуклеотидов в последовательностях			Chao 1	Шеннон	Симпсон	Пилелу	Фейта PD
К	10715 ± 740	412 ± 12	1546	421 (21)	1794	9.09	0.99	0.90	5.9
М	10666 ± 486	417 ± 10	904	290 (16)	1183	8.08	0.99	0.89	5.6
ML1	5230 ± 620	409 ± 12	1046	203 (16)	1213	7.81	0.98	0.86	3.8
ML2	5966 ± 322	421 ± 8	906	218 (16)	1226	7.66	0.98	0.91	3.4

рованным, и через 2 мес. доля последовательностей *Methylobacter* возросла до $15.28 \pm 3.2\%$ (6 ОТЕ), а *Methylosinus* до $0.19 \pm 0.1\%$ (рис. 1). Все ОТЕ *Methylobacter* относились к *M. tundripaludum* (98.12–99.06% сходства гена 16S рРНК с типовым штаммом), а ОТЕ *Methylosinus* – *M. sporium* (99.24% сходства) (табл. 2).

Основную по численности группу в почве с внесением лантана составляли метилотрофы рода *Methylotenera*, относящиеся к классу *Methylophilaceae* (рис. 1), которые образуют консорциумы с метанотрофными бактериями в мелководных ме-

тановых сипах (Данилова и соавт., 2021) и осадках озер (van Grinsven et al., 2021). Через 2 мес. доля последовательностей гена 16S рРНК *Methylotenera* превышала $19 \pm 1.30\%$ (рис. 1). Все они относились к *M. versatilis* (табл. 2), проявляя 98.12–98.46% сходства 16S рРНК с изолятом из донных осадков озера Вашингтон, США (Lapidus et al., 2011). В вариантах без внесения лантана были обнаружены также метилотрофные бактерии *Hyphomicrobium facile* (2 ОТЕ, $0.4 \pm 0.2\%$).

Таким образом, впервые установлено, что в почве умеренной климатической зоны внесение лантана на фоне повышения содержания метана, что характерно для агропочв с внесением органических и минеральных удобрений, приводит к абсолютному доминированию метанотрофов рода *Methylobacter* и облигатных метилотрофов рода *Methylotenera*. Скоординированная реакция *Methylobacter* и *Methylotenera* на внесение соли лантана позволяет предположить их совместную деятельность в регуляции обмена метана между почвой и атмосферой, что требует дальнейшего исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-24-00418.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов, полученных с использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

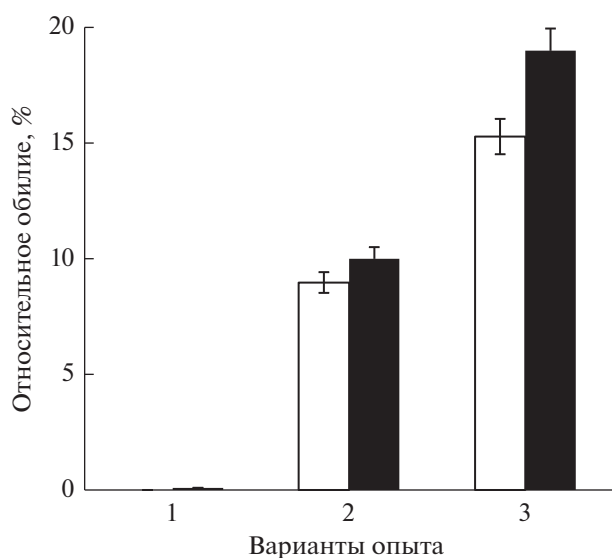


Рис. 1. Показатели относительного обилия доминирующих метанотрофных бактерий *Methylobacter* (белые столбики) и метилотрофных бактерий *Methylotenera* (черные столбики) в образцах почв эксперимента с микрокосмами. Обозначения вариантов опыта: 1 – М, 2 – ML1, 3 – ML2.

Таблица 2. Характеристики основных ОТЕ метанотрофных и метилотрофных бактерий, полученные в результате молекулярного анализа микробных сообществ почв инкубационного эксперимента

ОТЕ	Номер депонирования в NCBI	Представленность в сообществе, %	Ближайший родственник (NCBI номер)	Степень покрытия 16S рРНК, %	Сходство 16S рРНК, %
M–инкубация с метаном, 1 мес.					
S21-25	ON109140	0.23	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341, AJ414655)	100.0	100.0
			<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100.0	99.05
S21-21	ON109141	0.20	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341, AJ414655)	100.0	99.05
			<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100.0	98.12
S21-41	ON109142	0.38	Uncultured bacterium clone (JF135670)	100	100
			<i>Methylosinus sporium</i> (MT229167)	100	99.24
S21-979	ON109143	0.03	Uncultured <i>Methylocella</i> sp. clone OTU16 (MW143589)	100	98.48
			<i>Methylocella tundrae</i> isolate MTUNDRAET4	100	97.49
ML1–инкубация с метаном и лантаном, 1 мес.					
S21-278	ON109144	5.31	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341)	100	100
			<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100	99.06
S21-185	ON109145	3.54	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341)	100	99.76
			<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100	98.82
S21-299	ON109146	5.71	Uncultured <i>Methylotenera</i> sp. clone 11 (KX365915)	100	99.77
S21-173	ON109147	3.31	Uncultured <i>Methylophilaceae</i> bacterium clone 320 (MF042682)	100	99.76
S21-14	ON109148	0.27	<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain TWH1 (MK124972)	100	100
S21-131	ON109149	0.13	Uncultured <i>Hyphomicrobiaceae</i> bacterium clone C (JX505000)	100	100
			<i>Hyphomicrobium facile</i> (Y14312)	100	99.25
ML2–инкубация с метаном и лантаном, 2 мес.					
S21-507	ON109150	8.55	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341)	100	100
			<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100	99.06
S21-359	ON109151	6.05	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341)	100	99.76
			<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100	98.82
S21-472	ON109152	12.86	Uncultured <i>Methylotenera</i> sp. clone 11 (KX365915)	100	99.77
			<i>Methylotenera versatilis</i> isolate (MW010428)	100	98.12
S21-121	ON109153	2.04	<i>Methylotenera versatilis</i> isolate (MW010428)	100	98.46

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Данилова О.В., Иванова А.А., Терентьева И.Е., Глаголев М.В., Сабреков А.Ф. Разнообразие микробных сообществ, приуроченных к мелководным сипам в пойме реки Большая речка, Западная Сибирь // *Микробиология*. 2021. Т. 90. С. 601–612.
- Danilova O.V., Ivanova A.A., Terent'eva I.E., Glagolev M.V., Sabrekov A.F. Microbial community composition of floodplains shallow-water seeps in the Bolshaya Rechka floodplain, Western Siberia // *Microbiology (Moscow)*. 2021. V. 90. P. 632–642.
- Водяницкий Ю.Н., Рогова О.Б. Биогеохимия лантанидов в почвах // *Бюллетень Почвенного института им. Докучаева*. 2016. Вып. 84. С. 101–118.
- Котельникова А.Д., Рогова О.Б., Столбова В.В. Лантаноиды в почве: поступление, содержание, влияние на растения, генотоксичность (обзор) // *Почвоведение*. 2021. № 2. С. 216–223.
- Kotelnikova A.D., Rogova O.B., Stolbova V.V. Lanthanides in the soil: routes of entry, content, effect on plants, and genotoxicity (a review) // *Euras. Soil Sci.* 2021. V. 54. С. 117–134.
- Чимитдоржиева И.Б., Абашеева Н.Е. Влияние лантана на микробиологическую активность и динамику азотного фонда почв. Монография. Улан-Удэ: Изд-во БГСХА им. В.Р. Филиппова, 2014. 98 с.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // *Nature Meth.* 2010. V. 7. P. 335–336.
- Chistoserdova L. Lanthanides: New life metals? // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 32. Art. 138. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2088-2>
- Dutaur L., Verchot L.V. A global inventory of the soil CH₄ sink // *Glob. Biogeochem. Cycles*. 2007. V. 21. P. 1–9.
- Griffiths B.S., Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. P. 112–129.
- Krause S.M.B., Johnson T., Karunaratne Y.S., Fu Y., Beck D.A.C., Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 358–363.
- Lapidus A., Clum A., LaButti K., Kaluzhnaya M.G., Lim S., Beck D.A.C., Glavina del Rio T., Nolan M., Mavromatis K., Huntemann M., Lucas S., Lidstrom M.E., Ivanova N., Chistoserdov L. Genomes of three methylotrophs from a single niche reveal the genetic and metabolic divergence of the *Methylophilaceae* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 3757–3764.
- Ramos S.J., Dinali G.S., Oliveira C., Martins G.C., Moreira C.G., Siqueira J.O., Guilherme L.R. Rare earth elements in the soil environment // *Curr. Pollut. Rep.* 2016. V. 2. P. 28–50.
- Saunois M., Bousquet P., Poulter B., Pregon A., Ciais P., Canadell J.G., Dlugokencky E.J., Etiope G., Bastviken D., Houweling S., Janssens-Maenhout G., Tubiello F.N., Castaldi S., Jackson R.B., Alexe M., Arora V.K., Beerling D.J., Bergamaschi P., Blake D.R., Brailsford G., Brovkin V., Bruhwiler L., Crevoisier C., Crill P., Covey K., Curry C., Frankenberg C., Gedney N., Höglund-Isaksson L., Ishizawa M., Ito A., Joos F., Kim H.-S., Kleinen T., Krummel P., Lamarque J.-F., Langenfelds R., Locatelli R., Machida T., Maksyutov S., McDonald K.C., Marshall J., Melton J.R., Morino I., Naik V., O'Doherty S., Parmentier F.-J.W., Patra P.K., Peng C., Peng S., Peters G.P., Pison I., Prigent C., Prinn R., Ramonet M., Riley W.J., Saito M., Santini M., Schroeder R., Simpson I.J., Spahni R., Steele P., Takizawa A., Thornton B.F., Tian H., Tohjima Y., Viovy N., Voulgarakis A., van Weele M., van der Werf G.R., Weiss R., Wiedinmyer C., Wilton D.J., Wiltshire A., Worthy D., Wunch D., Xu X., Yoshida Y., Zhang B., Zhang Z., Zhu Q. The global methane budget 2000–2012 // *Earth Syst. Sci. Data*. 2016. V. 8. P. 697–751.
- Smith P., House J.I., Bustamante M., Sobocká J., Harper R., Pan G., West P.C., Clark J.M., Adhya T., Rumpel C., Paustian K., Kuikman P.M., Cotrufo F., Elliott J.A., McDowell R., Griffiths R.I., Asakawa S., Bondeau A., Jain A.K., Thomas M.J., Pugh A.M. Global change pressures on soils from land use and management // *Global Change Biol.* 2016. V. 22. P. 1008–1028.
- van Grinsven S., Damsté J.S.S., Harrison J., Polerecky L., Villanueva L. Nitrate promotes the transfer of methane-derived carbon from the methanotroph *Methylobacter* sp. to the methylotroph *Methylothera* sp. in eutrophic lake water // *Limnol. Oceanogr.* 2021. V. 66. P. 878–891.

The Effect of Lanthanum on the Composition of Methanotrophic Community of Sod-Podzolic Soil

I. K. Kravchenko^{1, *}, L. R. Sizov², E. N. Tikhonova¹, and L. V. Lysak³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia

³Faculty of Soil Science, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Received April 4, 2022; Revised April 27, 2022; Accepted May 20, 2022

Abstract—Lanthanum regulates the metabolism of microorganisms using single-carbon compounds, but there is no information about its effect on soil communities. The response of methanotrophic communities to the introduction of lanthanum was studied for the first time by high-performance sequencing of 16S rRNA in experiments with soil microcosms. It was found that after one and two months after the introduction of

lanthanum salts the proportion of *Methylobacter* in the total pool of sequences has increased by an order of magnitude up to 4 and 6%, respectively. At the same time, the content of methylotroph *Methylotheobacter* has raised up to 9 and 15%, respectively. Thus, lanthanum stimulates the formation of *Methylobacter–Methylotheobacter* associations under increased methane content in the soil, which may affect the contribution of agro-soils to the regulation of methane content in the atmosphere.

Keywords: agrosols, microbial diversity, high-throughput sequencing of 16S rRNA, *Methylobacter*, *Methylotheobacter*