

УДК 579.26:574.472:631.872

СУКЦЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ СОЛОМЫ ОВСА В ДВУХ РАЗНЫХ ТИПАХ ПОЧВ

© 2020 г. О. В. Орлова^{а, *}, А. А. Кичко^а, Е. В. Першина^а, А. Г. Пинаев^а, Е. Е. Андронов^{а, b, c}

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

^бСанкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^сПочвенный институт им. В.В. Докучаева, Пыжевский пер., 7, стр. 2, Москва, 397463 Россия

*e-mail: falenki@hotmail.com

Поступила в редакцию 22.10.2019 г.

После доработки 13.02.2020 г.

Принята к публикации 26.02.2020 г.

Исследовали сукцессии бактериальных сообществ при разложении соломы в образцах гумусовых горизонтов дерново-подзолистой почвы (Albic Retisols Abruptic) и чернозема (Haplic Chernozem (Pachic)) в условиях лабораторного эксперимента. На раннем, среднем и позднем этапах сукцессии определяли состав бактериальных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования библиотек по вариабельному участку V4 гена 16S рРНК. Филогенетический анализ показал, что разнообразие бактериального сообщества соломы по мере ее разложения в черноземе и дерново-подзолистой почве увеличивалось от 51 и 79 фило типов на третий день сукцессии, до 213 и 310 фило типов к концу эксперимента. На ранних этапах сукцессии (третий день) состав бактериального сообщества был представлен *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, на более поздних этапах (161 день) к ним добавились *Actinobacteria*. Для обоих типов почв бактериальная сукцессия при разложении соломы имела общие черты: начинают разложение соломы представители родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* из семейства *Xanthomonaceae* и рода *Chitinophaga* (*Bacteroidia*). На последующих этапах сукцессии, помимо актинобактерий, обнаруживались *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Следует отметить, что на протяжении всего периода разложения соломы в микробном сообществе присутствовали бактерии семейства *Rhizobiaceae*.

Ключевые слова: биоразнообразие, дерново-подзолистая почва (Retisols Abruptic), чернозем (Haplic Chernozem (Pachic)), высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.31857/S0032180X20090117

ВВЕДЕНИЕ

Процесс разложения растительных остатков в почвах является одной из важнейших статей глобального круговорота углерода и по количеству циркулирующего углерода уступает только процессу фотосинтеза. Поэтому не удивительно, что деструкция растительных остатков остается в центре внимания исследователей, несмотря на то, что основные факторы, контролирующие разложение, были выявлены в 1929 г. [27]. Однако понимание роли почвенных микробных сообществ в связи с функциями экосистем развивается только сейчас благодаря разработке новых методов для изучения структуры сообществ и метаболической активности [14, 23]. Лучшее знание микробных популяций и видов деятельности, связанных с деградацией органического углерода и структурированием почвенных сообществ в соответствии с источником углерода, может послужить концептуальной основой, помогающей определить связь между

структурой сообществ почвенных бактерий и их функцией в агроэкосистеме [15].

В процессах разложения растительных остатков в пахотных почвах, в отличие от естественных, главную роль зачастую играют бактерии, а не грибы. Более того, использование современных методов выявило значительный вклад бактерий даже в разложение лигнина и лигноцеллюлозных комплексов древесины, в сравнении с предшествующим убеждением о главенстве грибной микрофлоры в этих процессах [29]. Поэтому было важно изучить структуру бактериальных сообществ при трансформации соломы.

Влияние структуры сообщества почвенных микроорганизмов на результаты трансформации растительных остатков изучено недостаточно. Возможно, это связано с тем, что на состав и функционирование почвенного микробиома влияет множество факторов (например, влажность почвы, температура, pH, содержание органического ве-

щества и наличие питательных веществ, состав растительности и т. д.) и их сочетание [10, 13]. Поэтому не так просто вычленив из общей наблюдаемой картины особенности, связанные непосредственно с различиями в составе сообществ. Так, на биотрансформацию органического вещества структура микробного сообщества оказывает меньшее воздействие, чем изменения климата и/или изменение качества подстилки [13]. Один из способов – постановка экспериментов в строго контролируемых условиях, причем с использованием физического разделения субстрата от почвы. Очень важным стимулом к проведению этих экспериментов сегодня является доступность принципиально новых подходов, связанных с использованием высокопроизводительного секвенирования, позволяющего оценить динамику микробиоты во всей ее полноте [2, 14, 23].

Одним из множества факторов, определяющих характер разложения растительных остатков и структуру микробных сообществ в экологических нишах, связанных с растением, например, в ризосфере, является тип почвы [2, 19]. Относительно этого меньше влияние на структуру микробного сообщества вида биома [18] или землепользования [22]. Это связано с различиями в таких ключевых физико-химических свойствах почвы как pH [18, 22, 28], количество и качество органического вещества [14, 17]. Однако в опытах с насыпными почвами, перемешанными в другие климатические условия, было показано, что тип почвы может быть и не главным фактором, влияющим на структуру микробного сообщества [26]. С одной стороны, это влияние существенно затрудняет понимание особенностей процесса, так как фактор почвы, как уже указывалось ранее, наиболее существенен. Однако в том случае, когда для эксперимента взяты разные почвы, это позволяет вычленив общие для разных типов почв элементы динамики почвенного микробиома.

Солома зерновых культур, является важным возобновляемым источником органического вещества, ее внесение в пахотные почвы получает все большее распространение. На микробные процессы разложения соломы в почве влияют многие абиотические факторы, включая содержание влаги [10], засоление [23], качество и размер соломы [8] и так далее. Эти факторы могут повлиять на доступность соломы почвенным микроорганизмам и, таким образом, изменить скорость колонизации и характер разложения. Почвы являются своеобразным резервуаром микробного разнообразия. Любой субстрат, поступивший в почву, будет инициировать развитие микроорганизмов с учетом состава субстрата и исходя из набора таксонов в окружающей почве. Это должны быть в основном микроорганизмы, которые способны перерабатывать данный субстрат, однако для разных почв это могут

быть разные, но выполняющие одинаковые функции организмы.

Изучение состава микробных сообществ, участвующих в деструкции свежего органического вещества в пахотных почвах затруднено в случае перемешивания почвы и субстрата. Наиболее четко наличие сукцессии микробных сообществ при разложении растительных остатков было выявлено при анализе самих остатков, а не для детритосферы или основной почвы [6, 24]. С пространственной точки зрения разлагающиеся растительные остатки увеличивают гетерогенность почвы, создавая специфическую генетическую структуру микробных сообществ с образованием градиента от разлагаемого субстрата к почве без органического вещества [24]. Сделан вывод, что детритосфера и разлагающаяся биомасса соответствуют различным трофическим и функциональным нишам для микроорганизмов. В целом эти результаты свидетельствуют, что растительные остатки, как и живые корни, представляют “горячие точки” легкодоступного источника углерода и энергии, которые приводят к важной динамике сообщества, особенно когда почвенная система ограничена субстратом в отношении роста микроорганизмов. Растительные остатки, в том числе и солома, всегда обсеменены микроорганизмами, многие из которых могут обладать способностью к деградации сложных органических субстратов. Эти “нативные” микроорганизмы получают преимущество за счет своего физического положения на субстрате при внесении соломы в почву и могут существенно исказить влияние типа почвы на состав микробного сообщества. Следовательно, одним из способов более четкого выявления различий между типами почв по составу микробного детритивного сообщества, может стать анализ его динамики во внесенных стерильных растительных остатках, помещаемых в почву в нейлоновых мешочках с отверстиями, позволяющими микроорганизмам свободно достигать разлагаемого субстрата. Подобный подход со стерильным субстратом был применен при определении целлюлозоразлагающего метабенома в рубце коров [20], и с нестерильной соломой кукурузы [26].

Цель работы: исследование сукцессии структуры бактериальных сообществ при разложении соломы овса в разных типах почв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В модельном эксперименте изучали разложение соломы в образцах гумусовых горизонтов чернозема (Haplic Chernozem (Pachic) по WRB, Собщ $4.86 \pm 0.12\%$; pHсол 6.40 ± 0.08 ; Nобщ 0.533 ± 0.02) и дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol (Abruptic, Ochric) по WRB, Собщ $1.01 \pm 0.02\%$; pHсол 5.47 ± 0.02 ; Nобщ 0.212 ± 0.01). Почвы: чернозем типичный (Каменная степь, Воронеж-

ская обл.) и дерново-подзолистая почва (Псковская обл., ОПХ “Родина”) отобраны в 2018 г. с залежных участков с глубины 5–20–25 см. В опыте использовали измельченную солому овса (фракция 0–2 мм) со следующими показателями: зольность 9.98 ± 2.04 , Нобщ 1.897 ± 0.012 , С : N 23.5 , содержание водорастворимого углерода 11.8 ± 0.50 г/кг. Навески соломы (1 г) в мешочках размером 3×5 см, сшитых из нейлоновой ткани, были стерилизованы в отдельном полиэтиленовом пакете для каждого сосуда эксперимента с использованием электронно-лучевой стерилизации (18 кГр) в ООО “РАД” (г. Санкт-Петербург).

Для эксперимента использовали квадратные пластиковые сосуды объемом 2.3 л. Навески подготовленных почв (усредненных и просеянных через сито с диаметром отверстий 5 мм), увлажняли до 60% от полной влагоемкости (полная влагоемкость насыпных образцов для чернозема и дерново-подзолистой почвы 74.52 ± 1.66 и $42.48 \pm 0.95\%$ соответственно) и оставляли инкубироваться в условиях эксперимента на 2 нед. для установления равновесия. Этим приемом исключали влияние накладки эффекта временного увеличения эмиссии CO_2 из почвы после ее размалывания и увлажнения на рост дыхания после внесения соломы [11, 30]. Предварительно смоченные стерильной водой мешочки с соломой (по 15 штук на сосуд) помещали в почву вертикально на глубину 0.5–4 см. Повторность опыта – по 5 сосудов контроля и по 7 сосудов в вариантах с внесением соломы (в двух дополнительных сосудах отбор проб не производился, заложены для измерения дыхания в конце опыта, когда количество мешочков, попадающее под изолирующую камеру в основных сосудах, уменьшится). Расположение сосудов рендомизированное. Влажность поддерживалась на постоянном уровне бидистиллированной водой (сверху неплотно прикрыты пленкой для пищевых продуктов для уменьшения скорости высыхания и добавление воды по весу из пульверизатора два раза в неделю). Температура поддерживалась на уровне $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Отбор образцов соломы осуществляли путем изъятия одного мешочка из каждого сосуда варианта (кроме дополнительных сосудов), при длительности опыта 6 мес. отобрано 15 проб через 3–21 суток. Отобранные образцы замораживали и хранили при -70°C . Анализы соломы и почвы проводили общепринятыми методами [1] в 3–5-кратной повторности. На всем протяжении эксперимента еженедельно измеряли уровень эмиссии CO_2 абсорбционным методом [4].

Выделение ДНК производили с использованием набора реактивов Macherey-Nagel NucleoSpin Soil (“Macherey-Nagel”, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Механическое разрушение образца осуществлялось

с помощью гомогенизатора Precellys 24 (“Bertin Technologies”, Франция). Для оценки качества полученной ДНК проводился электрофорез в 1%-ном агарозном геле в $\times 0.5$ TAE буфере. Средняя концентрация ДНК в пробе составляла 50 нг/мкл. В дальнейшем матрицу использовали для создания библиотеки ампликонов, полученную методом ПЦР с применением универсальных праймеров на варибельный участок V4 гена 16S рРНК: F515 – GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA/R806 – GGACTACVSGGGTATCTAAT [7], включающих служебные последовательности и баркоды Illumina. Дальнейшие подготовка библиотек и секвенирование проводились в соответствии с рекомендациями производителя на платформе Illumina MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2×300 н).

Первичная обработка нуклеотидных последовательностей, в частности демультимплексирование образцов и обрезание баркодов, выполнена ПО Illumina. Дальнейший анализ проводился в программной среде R с помощью пакета dada2, который использует денойзинг с последующим объединением прямых и обратных прочтений и восстановлением исходных филоотипов (Amplicon Sequence Variant, ASV), также в нем осуществлялось устранение химер и таксономическая идентификация полученных ASV при помощи классификатора, обученного на базе данных SILVA [25]. Для уточнения таксономической принадлежности филоотипов была проведена дополнительная проверка части последовательностей при помощи алгоритма blast-n [5] по базе данных GenBank [12], которая затронула только ASV с высокой частотой встречаемости. В результате данной проверки были удалены филоотипы, относящиеся к рРНК пластид и митохондрий, а также для нескольких ASV удалось уточнить таксономию до уровня типа, класса, порядка или семейства. Для филогенетического анализа и построения филогенетических деревьев использовались программные пакеты MEGA7 с применением метода neighbour-joining и плагин fragment-insertion sepp в рамках пакета QIIME2 [9], также в QIIME2 проводилась оценка таксономического разнообразия сообществ (α - и β -разнообразии). Результаты анализа β -разнообразия представлены с помощью методов многомерной статистики (анализ главных компонент, PCA), а также в программе Emperior с использованием метрики UniFrac. Для оценки вклада отдельных филоотипов в различия между сообществами, основанного на частотах ASV, использовался статистический метод SIMPER (Similarity Percentage) [12], входящий в программный пакет PAST.

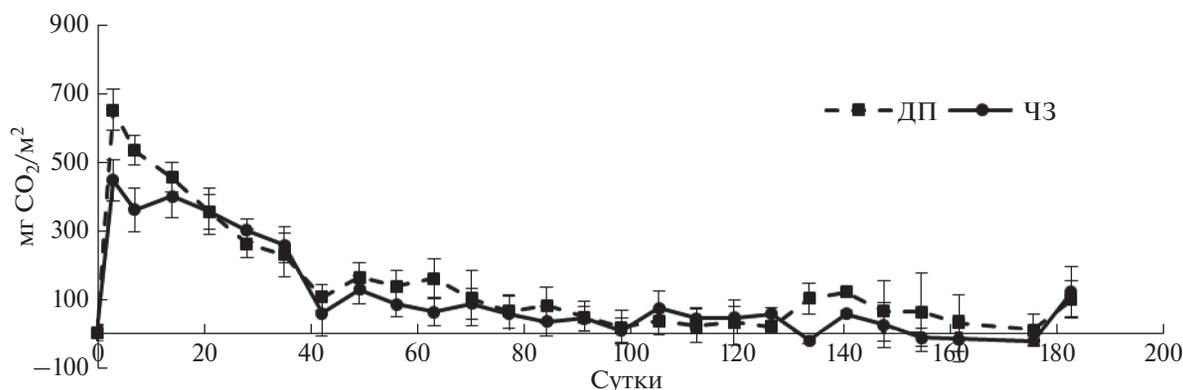


Рис. 1. Динамика приращения эмиссии CO_2 из чернозема (ЧЗ) и дерново-подзолистой (ДП) почвы за счет внесения соломы; уровень в контрольных почвах (без субстрата) принят за ноль.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная для модельного эксперимента солома овса за счет узкого соотношения С : N (23.5), измельчения и значительного содержания водорастворимого углерода (2.6% от общего углерода) является доступным для микроорганизмов субстратом. Поэтому динамика скорости выделения углекислого газа в вариантах с внесением соломы для обеих почв характерна скорее для легко-разлагаемых субстратов, например, глюкозы [3]: быстрое разложение в начале опыта, дающее узкий пик прироста эмиссии углекислоты (3 день) и далее спад. Одновременно, с первых дней, идет медленное нарастание дыхания вследствие разложения более труднорастворимых веществ (целлюлозы, гемицеллюлозы и др.). При анализе динамики уровня эмиссии CO_2 за счет внесения соломы, используя показания контрольных почв в качестве базового уровня, выявлено, что суммарные потери углерода из дерново-подзолистой почвы больше, чем из чернозема: соответственно 3913 ± 668 и $2981 \pm 297 \text{ CO}_2 \text{ мг/м}^2 \text{ сутки}$ (рис. 1). Особенно это заметно к концу опыта, когда в черноземе были более низкие значения эмиссии углекислоты в вариантах с соломой по сравнению с контролем. Следует отметить, что уровень выделения углекислого газа выше в среднем на $100 \text{ мг/м}^2 \text{ сутки}$ в течение всего срока наблюдений в контрольных вариантах для чернозема, чем для дерново-подзолистой почвы. Вероятно, большая эмиссия CO_2 при минерализации соломы в дерново-подзолистой почве связана с тем, что чернозем относится к числу более устойчивых экосистем с высоким уровнем гумификации.

На основании кривых дыхания почв были выбраны точки для определения состава микробного сообщества путем выделения этапов разложения соломы: ранний (3 и 28 дни), средний (91 день) и поздний (161 день). Оценка состава бактериального микробного сообщества в соломе осуществ-

лялась с использованием высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК.

По результатам секвенирования ампликонных библиотек участка гена 16S рРНК было получено 575597 прочтений, 295593 из которых вошли в последующий анализ. Филогенетический анализ показал высокое разнообразие бактериального сообщества соломы, в последний срок было идентифицировано соответственно для чернозема и дерново-подзолистой почвы 213 и 310 флотипов из 17 фил. Почва была единственным источником микроорганизмов, участвующих в разложении соломы в опыте, поэтому состав микробного сообщества соломы по основным филам близок к таковому для почв. Наиболее представленные бактериальные филы на 3 день были *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, на 161 день к ним добавились *Actinobacteria* (рис. 2). Стимуляцию таксона *Actinobacteria* к концу разложения отмечают многие исследователи [6, 24]. Можно отметить не только наличие, но и постепенное нарастание представленности неидентифицированных последовательностей в динамике. Для соломы, в отличие от почв, выявлено низкое обилие филы *Acidobacteria*, которая обычно является одной из наиболее распространенных таксономических групп почвенных бактерий. Аналогично отмечали уменьшение их доли для соломы пшеницы [6], также наблюдали отрицательную связь между уровнем внесения органических веществ в почву и обилием *Acidobacteria* [17]. Это позволяет сделать вывод о неучастии ацидобактерий в разложении соломы. Низкая представленность, главным образом на поздних этапах разложения, отмечается и для архей.

Состав микробиома соломы, начиная с 28 дня, имеет явные отличия в зависимости от источника микрофлоры (типа почв). Следовательно, наблюдаемые различия в функционировании микробных сообществ (по дыханию), происходящих из разных почв, нашли свое отражение в их составе.

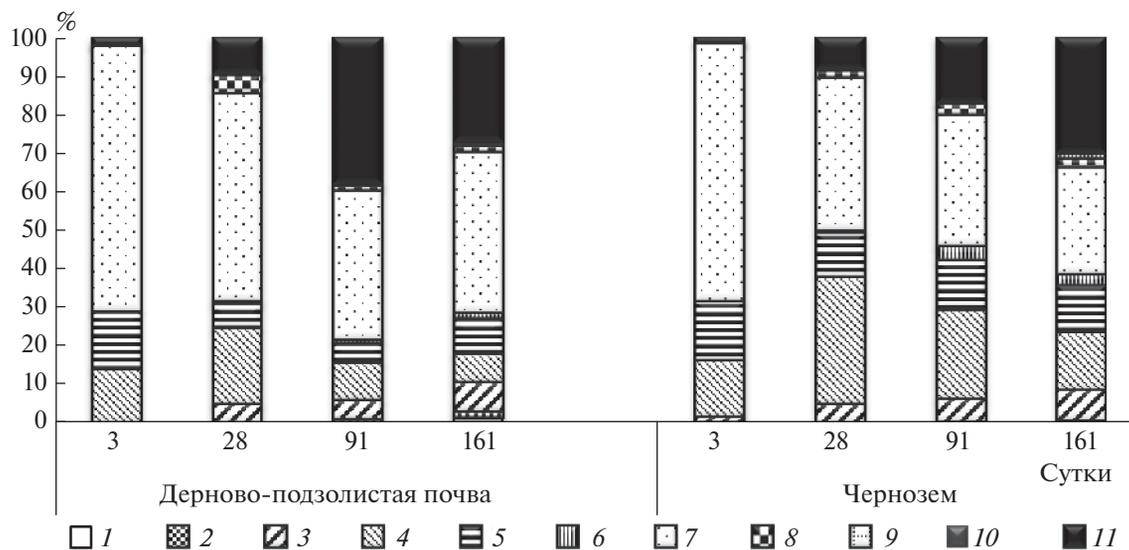


Рис. 2. Динамика представленности основных фил бактериального сообщества соломы в динамике в зависимости от почвы. Обозначения: 1 – *Archaea; Thaumarchaeota*, 2 – *Acidobacteria*, 3 – *Actinobacteria*, 4 – *Bacteroidetes*, 5 – *Firmicutes*, 6 – *Planctomycetes*, 7 – *Proteobacteria*, 8 – *Verrucomicrobia*, 9 – *Bacteria; Other* (филы с низкой долей), 10 – *unclassified Bacteria*, 11 – *Unclassified; Other*.

Роль типа почв, как источника бактерий, определялась, вероятно, как величиной pH, так и качеством и количеством органического вещества в них [14, 17, 18, 22, 28]. Для дерново-подзолистой почвы, по сравнению с черноземом, в среднем выше доля *Proteobacteria* и меньше *Bacteroidetes*, больше вклад неидентифицированных бактерий. Стоит отметить, что в соломе, разлагающейся в черноземе, практически нет ни архей, ни акцидобактерий. Для более кислой дерново-подзолистой почвы в соломе отмечено появление *Acidobacteria* начиная с 28 дня и большая их представленность на 161 день (1.63 против 0.15%).

Соотношение грамположительных и грамотрицательных бактерий характеризует олиготрофность почвенных процессов. Известно, что грамотрицательные бактерии требуют более богатого субстрата и на первых сроках при разложении соломы пшеницы [6] или соломы кукурузы [26] их количество увеличивается. В нашем опыте при биодеструкции соломы овса также наблюдали, что соотношение грамположительных и грамотрицательных бактерий увеличивается с 0.18–0.21 на 3 день до 0.31–0.41 на 161 день, то есть доля грамотрицательных бактерий постепенно уменьшается к поздним этапам разложения и олиготрофность микробного сообщества растет.

Наблюдали усложнение состава микробных сообществ соломы во времени после начала разложения. Наиболее вероятно, что параллельно идут два процесса: постепенное заселение соломы микроорганизмами из почвы через нейлоновую ткань и увеличение количества видов, задействованных в разложении труднодоступных соединений соло-

мы. Обогащение стерильной соломы микроорганизмами происходило быстро – на третий день количество обнаруживаемых фило-типов составило 46 в черноземе и 79 в дерново-подзолистой почве (табл. 1). Основной рост биоразнообразия произошел в течение первого месяца разложения, далее изменения слабее. Более сложные для деградации субстраты (например, лигнин), оставшиеся к последним этапам разложения, могут привести к стимуляции более разнообразного бактериального консорциума, способного их разлагать [24]. Особенностью нашего подхода, помимо стерильного субстрата, является изучение разложения соломы в “концентрированной” и физически отделенной от основной почвы экологической нише (мешочек с соломой), поэтому часть микробиоты поздних стадий разложения, плохо изученная и идентифицированная из-за меньшего обилия, нами была учтена. Рост обилия отдельных, мало представленных в сообществе исходной почвы, видов в 100–350 раз был отмечен для консорциумов, сформировавшихся на поздних стадиях разложения различных растительных остатков [21]. Стохастический фактор – “first come, first bite” также мог повлиять на процесс и таким образом стимулировать микробное разнообразие, как это было показано для консорциумов, отобранных с предварительно разлагавшихся остатков [21].

Аналогично меняются и все другие показатели биоразнообразия (индекс Фейта, индекс Шеннона), свидетельствуя о его росте с увеличением срока разложения соломы и недоступности субстрата. Необходимо отметить большее разнообразие бактериального сообщества разлагающейся

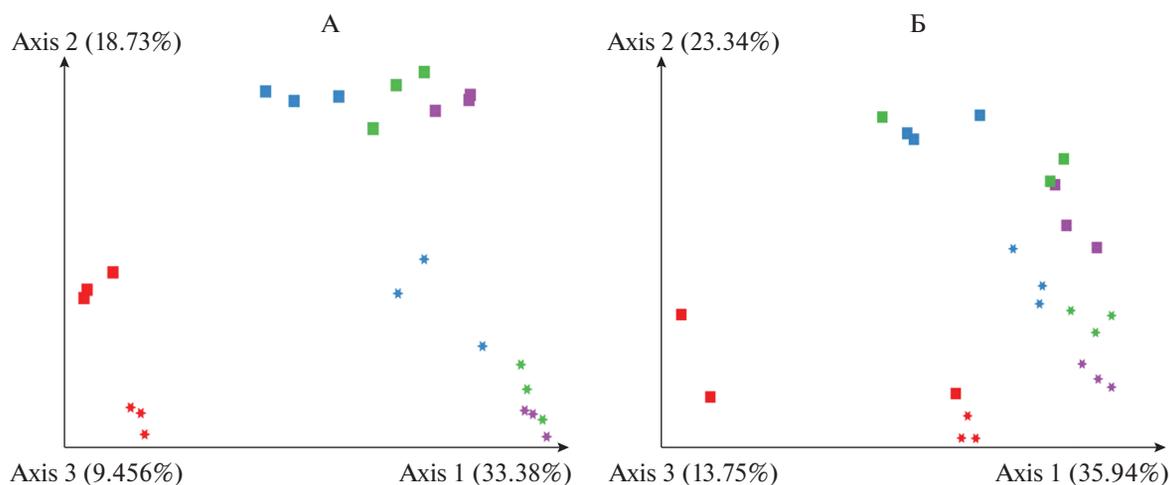


Рис. 3. Различия состава микробных сообществ по метрике UniFrac в координатах первых двух главных компонент (метод PCA). Обозначения: А – невзвешенные данные; Б – взвешенные данные. Форма: звезда – дерново-подзолистая почва; квадрат – чернозем. Цвет: красный – срок 3 дня; синий – срок 28 дней; зеленый – срок 91 день; фиолетовый – срок – 161 день.

соломы в дерново-подзолистой почве по сравнению с черноземом. Это противоречит данным, что микробные сообщества кислых почв менее разнообразны [16], но, возможно, причина в том, что в данном случае объектом исследования является не все микробное сообщество почв, а только его часть.

Метод главных компонент позволил выявить влияние типа почвы и времени разложения соломы на состав микробных сообществ (рис. 3). При анализе как невзвешенных данных (показывающем различия по качественному составу микробных сообществ, таксономическому разнообразию), так и взвешенных (включая представленность или долю каждого таксона), наиболее значительные различия видны в зависимости от типа почв. Следовательно, при постоянных гидротермических условиях, созданных в лаборатории, более существенным фактором, влияющим на состав микробиома соломы, а через него и на результат разложения оказался тип почвы, а не длительность разложения. В естественных условиях с перемещением типовых

почв по климатическим зонам [26], фактор типа почв оказался слабее, чем климат. Хотя и слабее, но сроки отбора влияли на состав бактериального сообщества соломы. Наиболее существенное различие в динамике для каждой почвы наблюдали между микробиомом, начинающим разложение соломы (третий день) и 28 днем, аналогично индексам, характеризующим биоразнообразие. Возможно, что это вызвано не только сукцессией микробных сообществ, но и влиянием на результаты третьего дня ДНК мертвого (как результата стерилизации) микробного сообщества соломы, резко отличающегося от такового в обеих почвах. Различия по составу бактериального сообщества чернозема сохраняются для всех сроков анализа, тогда как для дерново-подзолистой почвы последние два срока очень близки, особенно по таксономическому составу.

Обнаруживаются не только различия по составу микроорганизмов, ведущих разложение соломы в разных почвах, но и общие черты для обеих почв, что свидетельствует о едином направлении сук-

Таблица 1. Индексы, характеризующие биоразнообразие микробных сообществ соломы

Показатель	Дерново-подзолистая почва				Чернозем			
	3 день	28 день	91 день	161	3	28	91	161
Количество ОТЕ* (филотипов)	79.0 ± 8.0	253.8 ± 61.8	300.1 ± 35.5	313.0 ± 41.3	46.3 ± 15.7	154.4 ± 38.4	170.3 ± 18.7	212.5 ± 40.6
Индекс Шеннона	5.07 ± 0.31	6.86 ± 0.38	7.01 ± 0.18	7.23 ± 0.28	4.39 ± 0.66	5.75 ± 0.50	5.98 ± 0.46	6.69 ± 0.33
Индекс Пиелу	0.81 ± 0.04	0.87 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.88 ± 0.02	0.80 ± 0.06	0.82 ± 0.04	0.87 ± 0.06	0.87 ± 0.02
Индекс Фейта	9.9 ± 0.8	33.4 ± 5.0	41.9 ± 4.3	42.9 ± 4.4	5.8 ± 1.3	18.0 ± 2.8	23.2 ± 3.0	30.7 ± 4.1

* ОТЕ – операционная таксономическая единица.

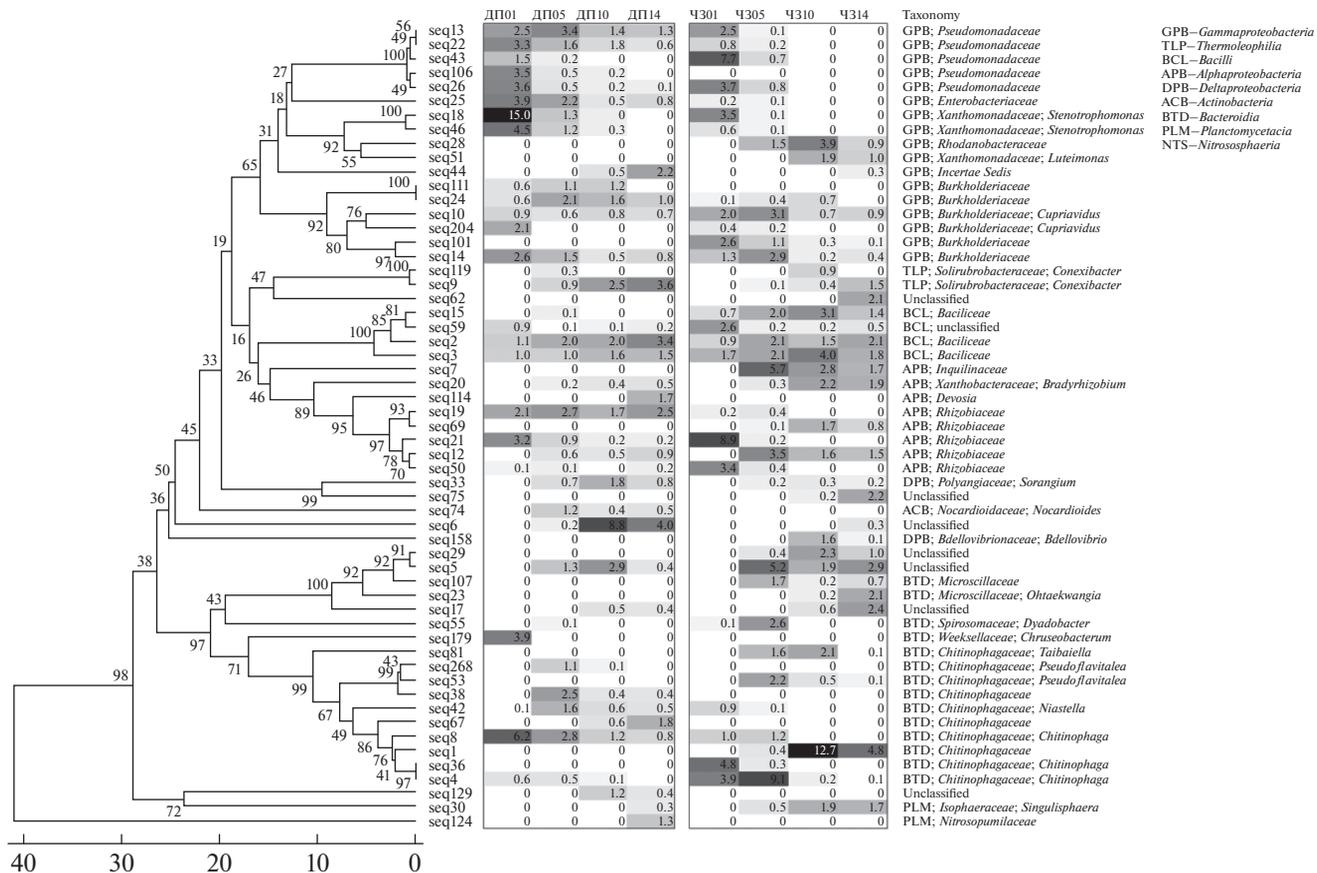


Рис. 4. Разнообразие и численность филотипов, наибольшим образом повлиявших на расхождение сообществ прокариот, разлагающих солому в дерново-подзолистой почве и черноземе на различных сроках инкубации по результатам статистического теста SIMPER. Обозначения: ДП – дерново-подзолистая почва, ЧЗ – чернозем; сроки: 01 – 3 день; 05 – 28 дней; 10 – 91 день; 14 – 161 день. Значения в тепловой карте соответствуют процентной доле филотипа в сообществе. Шкала дендрограммы отражает процент различающихся нуклеотидов в последовательностях, указана статистическая поддержка кластеров (bootstrap).

цессии микроорганизмов при разложении соломы, независимо от почвы. Наблюдаемая общепринятая динамика структуры микробного сообщества, по-видимому, связана с изменениями в наличии и качестве углеродных ресурсов, происходящими в процессе деградации соломы. В соответствии с экологическими характеристиками копиотрофных и олиготрофных популяций (упрощенно г- и К-стратегов), на ранних стадиях микробной сукцессии на свежих растительных остатках, поступивших в почву, будут доминировать копиотрофы и г-стратеги, при этом количество олиготрофов (К-стратегов) возрастает в относительном количестве при увеличении степени разложения субстрата. Так, различные представители рода *Pseudomonas* преобладающие на третий день (*Proteobacteria*, относимые к г-стратегам), постепенно сокращают свое участие в деструкционных процессах. В то же время представители фило *Actinobacteria* начинают появляться в сообществах разлагающих солому с 28-го дня, и их разнообразие постоянно увеличивается для обеих почв.

При оценке вклада каждого из таксонов в суммарное различие между бактериальными сообществами были выявлены филотипы, которые отвечают за расхождение сообществ на различных сроках проведения эксперимента. В эту категорию вошли только те ASV, вклад которых в различия между оцениваемыми сообществами составил не менее 1% по результатам статистического теста SIMPER (Similarity Percentage). Для дерново-подзолистой почвы и чернозема их число составило 42 и 46 филотипов соответственно (рис. 4). Рисунок позволяет наглядно показать сходство и различия в сукцессии при разложении соломы в разных типах почвы. В большинстве случаев почвы различаются по наличию и/или представленности (в процентах), динамике (уменьшается их доля или увеличивается) отдельных филотипов (виды, штаммы). Фактически, для каждого типа почв характерен набор разных филотипов, даже при сходном их филогенетическом положении. Наиболее значительные различия по набору фи-

лотипов в разных типах почв отмечены для *Xanthomonaceae*, *Chitinophagaceae* и *Pseudomonadaceae*.

Наибольший вклад на ранних стадиях разложения соломы отмечен для *Gammaproteobacteria* и отдельных филотипов *Bacteroidetes*. Начинают разложение легкодоступных органических соединений соломы представители рода *Pseudomonas*, рода *Stenotrophomonas* из семейства *Xanthomonaceae* и род *Chitinophaga* (*Bacteroidia*). Известно, что различные штаммы *Pseudomonas* sp. способны расщеплять органические материалы на более простые соединения, они являются копитрофными организмами [6]. В черноземе они играют значительную роль только в первый срок, тогда как для дерново-подзолистой почвы их вклад остается заметен и в последний срок. *Pseudomonas* spp. и *Neurospora* sp. были доминирующими на ранней стадии при разложении соломы пшеницы [6]. *Bacteroidetes* включают бактерии, широко распространенные в биосфере и выделенные из многих различных мест обитания, включая не только почву, но и кишечник животных. Возможно, что высокое их обилие связано с особенностями закладки эксперимента, когда создается высокая концентрация растительной биомассы. Филоотипы этого таксона были обильны на всех этапах разложения, однако часто это были разные представители не только в зависимости от типа почвы, но и срока. На третий день преобладали филоотипы рода *Chitinophaga*, причем для чернозема 4, для дерново-подзолистой почвы – 2. Даже совпавшие филоотипы в разных почвах имели неодинаковое обилие либо зеркальную динамику. Чаше бактерии имели заметную (более 1%) представленность на средних и последних сроках анализа; помимо семейства *Chitinophagaceae* (рода: *Chitinophaga*, *Flavitalea*, *Niastella*, *Pseudoflavitalea*, *Taibaiella* и неидентифицированных представителей семейства) в разложении соломы принимали участие *Microscillaceae* (*Ohtaekwangia*, более характерны для чернозема), *Spirosomaceae* (род *Dyadobacter*). Аналогично вели себя и бактерии из филы *Bacilli*, то есть их состав и динамика сильно зависели от типа почвы. Интересно, что актинобактерии, вносящие существенный вклад в разложение соломы, практически не попали в число филоотипов, существенно влияющих на различия между сообществами.

Однако не все обнаруженные филоотипы были способны к деструкции растительных остатков. Данные, приведенные на рисунке 4, свидетельствуют о значительном вкладе семейства *Rhizobiaceae*, к которому, в частности, относятся клубеньковые бактерии, в состав микробных сообществ соломы для обеих почв. Вероятно, образующихся легкодоступных органических соединений при интенсивном разложении соломы в течение всего периода наблюдений достаточно для обеспечения

существенного вклада данных микроорганизмов в состав микробиома соломы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря использованию стерильной соломы удалось выявить существенное влияние микробно-ценозов исследуемых типов почв на состав микробных сообществ разлагающейся соломы овса. Это может быть связано с тем, что обычно на соломе (или других растительных остатках) присутствуют микроорганизмы, которые, включаясь в ее деструкцию, “маскируют” влияние других факторов. Различия в таксономическом составе сообществ за счет типа почв, приводили к тому, что зачастую одинаковые функции выполняли разные филоотипы при близком их таксономическом положении (принцип дублирования). Зафиксировано увеличение с ростом разложения соломы доли и разнообразия неидентифицированных последовательностей в обеих почвах. Возможно, обнаруженные нами неидентифицированные последовательности принадлежат нативной почвенной микрофлоре, как медленно растущей на сложных субстратах (нет возможности повторить в лабораторных средах), так и растущей только в ассоциациях (не способны расти в отсутствие партнеров). В обоих случаях микроорганизмы являются некультивируемыми, чем объясняется их отсутствие в базах данных. Сукцессия микробных сообществ, при использованной нами методике проведения опыта, была четко видна и имела общие черты в обоих типах почв.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ВНИИСХМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы были проведены за счет финансовой поддержки гранта РФ 18-16-00073.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агрохимические методы исследования почв / Под ред. Соколова А.В. М.: Наука, 1975. 656 с.

2. *Зверев А.О., Першина Е.В., Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Серикова Е.Н.* Метагеномная характеристика ризосферного эффекта при выращивании злаковых культур в черноземной и дерново-подзолистой почвах // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Вып. 51(5). С. 654–663.
<https://doi.org/10.15389/agrobiolody.2016.5.654rus>
3. *Паников Н.С.* Кинетические механизмы процессов разложения органического вещества в почве // *Проблемы почвоведения*. М., 1990. С. 95–101.
4. *Шарков И.Н.* Сравнительная характеристика двух модификаций абсорбционного метода определения дыхания почв // *Почвоведение*. 1987. № 10. С. 153–157.
5. *Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
6. *Bastian F., Bouziri L., Nicolardot B., Ranjard L.* Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure // *Soil Biol. Biochem.* 2009. V. 41. № 2. P. 262–275.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.024>
7. *Bates S.T., Berg-Lyons J.G., Caporaso W.A., Walters W.A., Knight R., Fierer N.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *ISME J.* 2010. № 5. P. 908–917.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.171>
8. *Bending G.D., Turner M.K., Jones J.E.* Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities // *Soil Biol. Biochem.* 2002. V. 34. № 8. P. 1073–1082.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00040-8)
9. *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 // *Nat. Biotechnol.* 2019. № 37. P. 852–857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
10. *Brockett B.F., Prescott C.E., Grayston S.J.* Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 44. № 1. P. 9–20.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.09.003>
11. *Carbone M.S., Still C.J., Ambrose A.R., Dawson C.J., Still A.R., Ambrose T.E., Dawson A.P., Williams C.M., Boot S.M., Schaeffer J., Schimel P.* Seasonal and episodic moisture controls on plant and microbial contributions to soil respiration // *Oecologia*. 2011. V. 167. № 1. P. 265–278.
<https://doi.org/10.1007/s00442-011-1975-3>
12. *Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W.* *GenBank* // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44(D1). P. D67–D72.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
13. *Cleveland C.C., Reed S.C., Keller A.B., Nemergut D.R., O'Neill S.P., Ostertag R., Vitousek P.M.* Litter quality versus soil microbial community controls over decomposition: a quantitative analysis // *Oecologia*. 2014. V. 174. № 1. P. 283–294.
<https://doi.org/10.1007/s00442-013-2758-9>
14. *Crecchio C., Curci M., Pellegrino A., Ricciuti P., Tursi N., Ruggiero P.* Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39. № 6. P. 1391–1400.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.12.016>
15. *Drenovsky R.E., Feris K.P., Batten K.M., Hristova K.* New and current microbiological tools for ecosystem ecologists: towards a goal of linking structure and function // *Am. Midland Natur.* 2008. V. 160. № 1. P. 140–160.
[https://doi.org/10.1674/0003-0031\(2008\)160\[140:NACMTF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2008)160[140:NACMTF]2.0.CO;2)
16. *Fierer N., Jackson R.B.* The diversity and biogeography of soil bacterial communities // *Proc. Nation. Acad. Sci.* 2006. V. 103. № 3. P. 626–631.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
17. *Fierer N., Bradford M.A., Jackson R.B.* Toward an ecological classification of soil bacteria // *Ecology*. 2007. V. 88. № 6. P. 1354–1364.
<https://doi.org/10.1890/05-1839>
18. *Fierer N., Strickland M.S., Liptzin D., Bradford M.A., Cleveland C.C.* Global patterns in belowground communities // *Ecol. letters*. 2009. V. 12. № 11. P. 1238–1249.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01360.x>
19. *Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S.* Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 3. P. 1800–1809.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1800-1809.2003>
20. *Hess M., Sczyrba A., Egan R., Kim T.W., Chokhawala H., Schroth G., Luo S. et al.* Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen // *Sci.* 2011. V. 331. (6016). P. 463–467.
<https://doi.org/10.1126/science.1200387>
21. *Jiménez D.J., de Lima Bossi M.J., Schückel J., Kračun S.K., Willats W.G. T., van Elsas J.D.* Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics- and metasecretomics-based approaches // *Appl. Microbiol. Biotech.* 2016. V. 100. № 24. P. 10463–10477.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7713-3>
22. *Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N.* The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40 № 9. P. 2407–2415.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>
23. *Muhammad S., Müller T., Joergensen R.G.* Decomposition of pea and maize straw in Pakistani soils along a gradient in salinity // *Biol. Fert. Soils*. 2006. V. 43. № 1. P. 93–101.
<https://doi.org/10.1007/s00374-005-0068-z>
24. *Nicolardot B., Bouziri L., Bastian F., Ranjard L.* A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communi-

- ties // *Soil Biol. Biochem.* 2007. V. 39. № 7. P. 1631–1644.
<https://doi.org/0.1016/j.soilbio.2007.01.012>
25. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41 (D1). P. D590–D596.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
26. Sun B., Wang X., Wang F., Jiang Y., Zhang X.X. Assessing the relative effects of geographic location and soil type on microbial communities associated with straw decomposition // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 11. P. 3327–3335.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00083-13>
27. Tenney F.G., Waksman S.A. Composition of natural organic materials and their decomposition in the soil: IV. The nature and rapidity of decomposition of the various organic complexes in different plant materials, under aerobic conditions // *Soil Sci.* 1929. V. 28. № 1. P. 55.
28. Wakelin S.A., Macdonald L.M., Rogers S.L., Gregg A.L., Bolger T.P., Baldock J.A. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. № 3. P. 803–813.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.10.015>
29. Wilhelm R.C., Singh R., Eltis L.D., Mohn W.W. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing // *The ISME J.* 2019. V. 13. № 2. P. 413.
<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0279-6>
30. Wu H.J., Lee X. Short-term effects of rain on soil respiration in two New England forests // *Plant and Soil.* 2011. V. 338. № 1–2. P. 329–342.
<https://doi.org/10.1007/s11104-010-0548-2>

Succession of Bacterial Communities in the Decomposition of Oats Straw in Two Soils with Contrasting Properties

O. V. Orlova^{1,*}, A. A. Kichko¹, E. V. Pershina¹, A. G. Pinaev¹, and E. E. Andronov^{1,2,3}

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, 196608 Russia

²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

³Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, 397463 Russia

*e-mail: falenki@hotmail.com

The significance of soil genesis for the composition and succession of bacterial community during straw decomposition was studied. Sterile grinded oat straw in nylon bags was placed in humus horizons of two soils (soddy-podzolic and chernozems; Albic Retisol (Abruptic, Ochric) and Haplic Chernozem (Pachic)) and incubated in the laboratory under constant hydrothermal conditions. On the basis of respiration dynamics (measured by absorption method) the stages of straw decomposition (early, middle and late) were specified. For each stage, the composition of bacterial communities was determined by high-performance sequencing of amplicon libraries of the variable region V4 of the 16s rRNA gene. It was shown that carbon losses due to decomposition of straw from the soddy-podzolic soil were higher than those from chernozem: 3913 ± 668 and 2981 ± 297 CO₂ mg/m² day, respectively. Phylogenetic analysis showed an increase in the diversity of the bacterial community in the process of straw decomposition: from 51 and 79 on the third day, up to 213 and 310 phylotypes from 17 phyla on the last day, for chernozem and soddy-podzolic soil, respectively. On the third day, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes* were mostly represented; on the day 161, *Actinobacteria* were added. Soil had a significant impact on the taxonomic composition of straw communities. For the microbial community of straw formed on the basis of the microbiocenosis of soddy-podzolic soil the proportion of *Proteobacteria* was higher, but *Bacteroidetes* was lower, and the contribution of unidentified prokaryotes was more significant. Bacterial succession during straw decomposition had common features for both soils. The decomposition started with the quick consuming of easily available organic compounds of straw by copyiotrophs, representatives of the *Pseudomonas* genus, the *Stenotrophomonas* genus from the family of *Xanthomonaceae*, and the *Chitinophaga* (*Bacteroidia*) genus. In addition to actinobacteria, the oligotrophs were represented by *Firmicutes* and part of *Bacteroidetes*. Throughout the entire observation period, probably due to the formation of available organic compounds during the decomposition of straw, the contribution of bacteria of the *Rhizobiaceae* family was significant.

Keywords: biodiversity, soddy-podzolic soil (Albic Retisol (Abruptic, Ochric)), Chernozem (Haplic Chernozem (Pachic)), bacterial community, NGS, 16S pRNA