

УДК 631.461

## ПРОКАРИОТНЫЙ КОМПЛЕКС КОПРОЛИТОВ *APORRECTODEA CALIGINOSA* И *LUMBRICUS TERRESTRIS*

© 2021 г. В. Ю. Шахназарова<sup>a, b</sup>, А. В. Якушев<sup>c, \*</sup>, К. Л. Якконен<sup>a</sup>,  
А. А. Кичко<sup>b</sup>, Т. С. Аксенова<sup>b</sup>, Н. П. Битюцкий<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199178 Россия

<sup>b</sup>ВНИИСХМ, шоссе Подбельского, 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург, 196608 Россия

<sup>c</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: a\_yakushev84@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.

После доработки 01.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

Впервые с помощью методов метагеномики проведено сравнительное исследование влияния дождевых червей двух видов (*Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus terrestris*) на состав прокариотного комплекса дерново-подзолистой почвы. Прокариоты в почве и копролитах были представлены преимущественно филами *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*. Пассаж почвы через кишечник дождевых червей отражался на обилии некоторых таксонов ее прокариотного блока, но не на общих показателях биоразнообразия. В копролитах червей обоих видов регистрировали уменьшение обилия фил *Acidobacteria* и *Gemmatimonadetes*, включающих преимущественно олиготрофные бактерии, в копролитах *L. terrestris* — увеличение доли фил *Actinobacteria* и *Firmicutes*, представленных в основном копиотрофами и гидролитами. Кроме того, в копролитах *L. terrestris* возрастало обилие анаэробных бактерий *Clostridiaceae* и способных к нитратному дыханию *Flavobacterium*, по-видимому, вследствие возникновения в трансформированной червями почве анаэробных условий. В целом изменения таксономической структуры прокариот в почве, обработанной *L. terrestris*, были более масштабными, чем в почве, обработанной *A. caliginosa*. Эти различия между копролитами червей изученных видов могут быть обусловлены особенностями функционирования их пищеварительных систем, приспособленных к трансформации отличающихся по составу источников питания.

**Ключевые слова:** таксономический состав, кишечное сообщество, бактерии, таксономическое биоразнообразие

DOI: 10.31857/S0032180X21040134

### ВВЕДЕНИЕ

Дождевые черви — одна из важнейших групп почвенных животных, существенно влияющая на плодородие почв и рост растений [12]. Благодаря высокой локомоторной и пищевой активности, дождевые черви модифицируют структуру почвы и стабильность ее агрегатов, скорость гумификации органического материала и доступность элементов минерального питания растениям [10, 11]. В процессах минерализации органического вещества ключевую роль играют почвенные микроорганизмы. Дождевые черви способны модифицировать структуру и свойства микробного сообщества почвы [2, 23], что в комбинации с непосредственным измельчением и перевариванием пищи этими беспозвоночными животными стимулирует разложение ими растительных остатков [22].

Молекулярно-генетический анализ микроорганизмов открывает новые перспективы в изучении механизмов воздействия дождевых червей на почвенные процессы. Исследования подобного рода уже проводились в отношении червей отдельных видов, обитающих в некоторых почвах [8, 9, 20]. Однако сравнительные молекулярно-генетические исследования влияния на таксономический состав почвенных микроорганизмов дождевых червей, принадлежащих к разным экологическим группам, до сих пор не предпринимались. Недостаточно исследован состав прокариотного комплекса копролитов двух самых распространенных на Северо-Западе России видов дождевых червей: *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) и *Lumbricus terrestris*. Если *A. caliginosa* — из группы эндогеинных дождевых червей, предпочитающих поглощать почву [5], то *L. terrestris* — типичный

“норник”, питающийся в основном растительным опадом с поверхности почвы [6].

Цель работы — изучить влияние дождей червей двух видов (*A. caliginosa* и *L. terrestris*) на биологическое разнообразие и таксономическую структуру прокариотического сообщества дерново-подзолистой почвы.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Исследовали дождевых червей двух видов: *A. caliginosa* и *L. terrestris*, отобранных вручную в Ломоносовском районе Ленинградской области. В качестве субстрата для содержания червей использовали гумусово-аккумулятивный горизонт дерново-подзолистой глееватой супесчаной почвы (Albic Glossic Retisol (Epiarenic Endoloamic, Cutanic, Ochric)). Ее отбор осуществляли в местах обитания дождевых червей исследованных видов. Агрохимическая характеристика почвы:  $pH_{H_2O}$  5.9,  $pH_{KCl}$  4.9,  $C_{орг}$  2.4%,  $N_{общ}$  0.1%,  $P_2O_5$  77.7 мг/кг,  $K_2O$  160.7 мг/кг. Общее содержание азота и углерода в почве определяли с помощью CHN-анализатора LECO CHN628 (США). Реакцию среды почв и копролитов измеряли в водной вытяжке с помощью pH-метра. Подвижные формы фосфора и калия извлекали 0.2 М раствором HCl при соотношении почва : раствор 1 : 5.

**Инкубация дождевых червей в почве и получение копролитов.** Дождевых червей предварительно выдерживали в воде при 6°C в течение трех суток до полного очищения их пищеварительного тракта от почвы, поглощенной в местах обитания [1]. У дождевых червей газообмен осуществляется через покровы тела (жабры), и погружение этих беспозвоночных животных в воду не приводит к нарушению их дыхания. С уменьшением температуры растворимость в воде кислорода возрастает. Поэтому низкая температура воды способствовала сохранению высокой активности дождевых червей в период очищения их пищеварительного тракта. Затем дождевых червей помещали в наполненные почвой пластиковые сосуды объемом 1 л и инкубировали их при комнатной температуре 7 сут. Влажность почвы поддерживали на уровне 60% от ее полной влагоемкости. Контрольную почву инкубировали в идентичных условиях, но без червей. Затем червей извлекали из почвы, помещали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу и инкубировали еще в течение суток для получения копролитов и их последующего анализа.

**Микробиологическое исследование.** Таксономический состав бактерий и архей в почве и копролитах определяли с помощью анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена *16s* рРНК. Сырой экстракт ДНК извлекали из

почвы (0.25 г) экстрагирующим буфером (700 мкл) и смесью фенола и хлороформа (1 : 1 по объему, 400 мл) при встряхивании с керамическими шариками диаметром 0.1 и 0.5 мм в гомогенизаторе FastPrep 24 (MP Medicals, США). В качестве экстрагирующего буфера использовали смесь двух растворов: А — 200 мМ натрий-фосфатный буфер, 240 мМ гуанидин изотионат, pH 7.0; Б — 500 мМ Tris-HCl, 1%-ный раствор додецилсульфата натрия в соотношении 1 : 1 (по массе к объему). Далее образцы центрифугировали 5 мин при 14000 g, отбирали супернатант и проводили повторную экстракцию в хлороформ-изоамиловом спирте с последующим центрифугированием. С целью осаждения ДНК к супернатанту добавляли изопропиловый спирт в объемном соотношении 1 : 1, после чего полученную смесь перемешивали встряхиванием и центрифугировали 5 мин до получения плотного осадка ДНК. Осадок промывали 70%-ным этанолом, высушивали при комнатной температуре и растворяли в деионизированной воде в течение 10 мин при 65°C. Полученный сырой экстракт ДНК очищали при помощи электрофореза в 1%-агарозном геле с последующей сорбцией ДНК на SiO<sub>2</sub>.

Библиотеки ампликонов создавали методом полимеразной цепной реакции с использованием широкоспецифичных универсальных праймеров на вариабельный участок V4 гена *16S* рРНК (ferier\_F515: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/ferier\_R806:GGACTACVSGGGTATCTAAT) с добавлением линкеров и уникальных баркодов [15]. Дальнейшую подготовку проб и пиросеквенирование проводили на платформе Roshe GS Junior (Roshe, Швейцария) в соответствии с рекомендациями производителя. Для обработки полученных библиотек использовали инструментарий программного пакета QIIME: демультиплексирование, фильтрацию последовательностей по качеству прочтения и количеству гомополимеров, объединение в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при пороге сходства 97%, удаление химер и таксономический анализ [13]. Для оценки разнообразия прокариотного сообщества рассчитывали индексы Симпсона, Шеннона, Менхиника, Маргалефа, Чао и коэффициент выравнивания [7].

**Математическая обработка данных.** Повторность опытов для анализа прокариотной ДНК пятикратная. Достоверность различий между средними значениями долей амплифицированных фрагментов ДНК оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе IBM SPSS Statistics Version 25 с использованием непараметрического Т3-критерия Даннета. Выбор этого критерия был обусловлен неоднородностью дисперсий данных, которую оценивали с помощью критерия Левена. Достоверным считались различия при  $p < 0.05$ . В таблицах и тексте статьи приведены средние значения ± стандартные отклонения.

**Таблица 1.** Индексы альфа-разнообразия и число ОТЕ прокариотного сообщества в почве и копролитах *L. terrestris* и *A. caliginosa*. Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий между средними значениями обилия для данного таксона в вариантах опыта

Индекс	Почва	Копролиты	
		<i>L. terrestris</i>	<i>A. caliginosa</i>
Среднеарифметическое число ОТЕ	920 $\pm$ 198 <sup>a</sup>	716 $\pm$ 36 <sup>a</sup>	768 $\pm$ 49 <sup>a</sup>
Менхиника	13.9 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	13.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
Маргалефа	61.6 $\pm$ 15.6 <sup>a</sup>	54.8 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	61.6 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>
Симпсона	0.992 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.993 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.993 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
Шеннона	5.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Выравненности	0.91 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Чao1	1095 $\pm$ 316 <sup>a</sup>	948 $\pm$ 116 <sup>a</sup>	1051 $\pm$ 184 <sup>a</sup>

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднеарифметические значения числа ОТЕ и индексов биоразнообразия прокариотических комплексов копролитов дождевых червей достоверно не отличались от таковых в контрольной почве (табл. 1). Очевидно, пассаж почвы через кишечник существенно не изменял биоразнообразие ее прокариотного блока. Согласно расчетам, доля ОТЕ бактерий в почве составила  $98.5 \pm 0.3\%$ , в копролитах *A. caliginosa* —  $96.9 \pm 1.8\%$ , в копролитах *L. terrestris* —  $97.4 \pm 1.6\%$ . Доля архей, представленных в основном классом *Thaumarchaeota*, в почве, копролитах *A. caliginosa* и *L. terrestris* —  $0.2 \pm 0.4$ ,  $0.8 \pm 1.6$  и  $0.8 \pm 1.4\%$  соответственно. Следовательно, пассаж почвы через пищеварительную систему дождевых червей не сопровождался значительными изменениями соотношения архей и бактерий в ее составе.

Бактерии в почве и копролитах были преимущественно представлены филами *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* (рис. 1, табл. 2). В копролитах червей обоих видов доли фил *Acidobacteria* и *Gemmatimonadetes* были в 2–3 раза меньше по сравнению с исходной почвой, а в копролитах *L. terrestris* возростала доля фил *Actinobacteria* и *Firmicutes*.

По сравнению с исходной почвой в копролитах червей обоих видов уменьшалась доля входящих в филу *Acidobacteria* классов DA052, *Acidobacteria*, *Acidobacteria-5*, а также порядков *Acidobacteriales*. Кроме того, в копролитах *L. terrestris* снижалась доля класса *Acidobacteriia-6*, а в копролитах *A. caliginosa* — *Candidatus Koribacter*. В составе филы *Actinobacteria* также происходили зоогенные изменения. В копролитах *A. caliginosa* возростала доля семейств *Micrococaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Iamiaceae* и рода *Iamia*, в копролитах *L. terrestris* — семейств *Microbacteriaceae*, *Streptomyetaceae*, *Sinobacteraceae* и рода *Kribbella*, в копролитах обоих

червей — классов *Actinobacteria*, порядка *Actinomycetales* на фоне уменьшения обилия семейства *Koribacteraceae*. В филе *Gemmatimonadetes* оба червя уменьшали доли классов *Gemmatimonadetes* и *Gemm-1*, а *L. terrestris* — еще и порядка N1423WL. В филе *Chloroflexi* доля порядка *Roseiflexales* и семейства *Kouleothrixaceae* уменьшилась в копролитах *L. terrestris*. Доля класса *Pedosphaerae* и порядка *Pedosphaerales* (фила *Verrucomicrobia*), а также порядка *Muxococcales* (фила *Proteobacteria*) снизилась после прохождения почвы через кишечный тракт червей обоих видов. В то же время доля бактерий класса *Deltaproteobacteria* (фила *Proteobacteria*) уменьшилась лишь в копролитах *L. terrestris*. Кроме того, в копролитах *L. terrestris* возростала доля семейства *Clostridiaceae* (фила *Firmicutes*), а также класса *Flavobacteriia*, порядка *Flavobacteriales*, семейства *Flavobacteriaceae*, рода *Flavobacterium* (фила *Bacteroidetes*). При этом снизилась доля класса *Phycisphaerae* филы *Planctomycetes*. В то же время обилие относящегося к этой филе рода *Pirellula* уменьшилось в копролитах червей обоих видов.

Отмеченный эффект уменьшения под влиянием *A. caliginosa* и *L. terrestris* обилия филы *Acidobacteria* характерен, по-видимому, для червей многих видов. Недавно опубликованы аналогичные данные об сокращении обилия филы *Acidobacteria* в копролитах *A. caliginosa* [9]. Снижение доли филы *Acidobacteria* и входящих в нее класса *Acidobacteriia-6*, а также порядка *iii1-15* обнаружено при пассаже почвы через кишечник *Eisenia fetida* [14] и *Lumbricus rubellus* [21].

Фила *Acidobacteria* представляет собой типичные некультивируемые почвенные бактерии, значительная часть которых — умеренные ацидофилы. Для таких бактерий могут быть одинаково неблагоприятны как подщелачивание почвы при ее прохождении через кишечник дождевых червей [1, 3], так и перемешивание в кишечнике червей почвы, вызывающее уменьшение в ней количества локу-

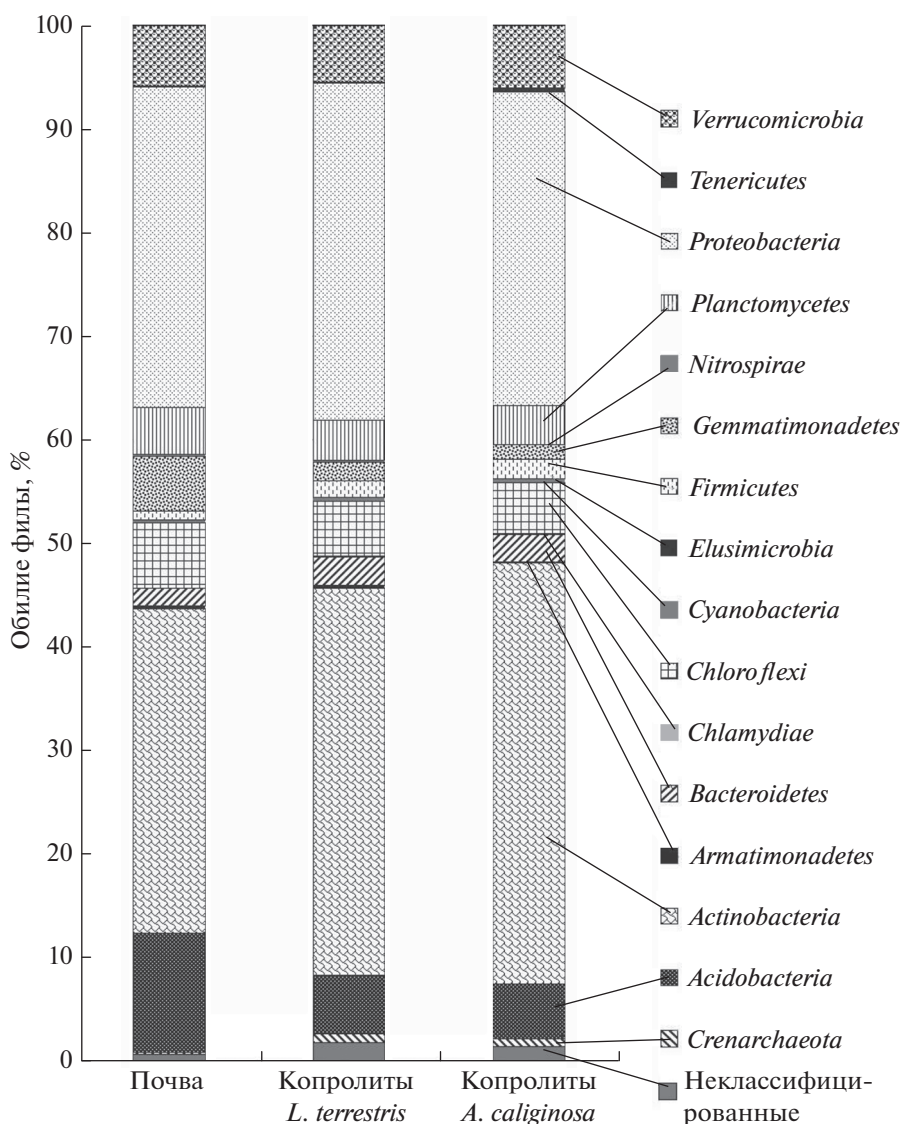


Рис. 1. Доля фил прокариот в почве и копролитах *L. terrestris* и *A. caliginosa*.

сов с низкими значениями pH. Отмеченное уменьшение в копролитах обилия представителей *Acidobacteria*, а также филы *Gemmatimonadetes* и отдельных представителей фил *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes* может быть связано с зоогенной активизацией в почве гидролитических процессов [24]. В результате копролиты червей обогащаются лабильными формами органического вещества, что и приводит к уменьшению доли олиготрофов в почвенном сообществе микроорганизмов. Не случайно, обилие олиготрофных бактерий в копролитах *A. caliginosa* вновь возрастает по мере их старения [9].

В отличие от филы *Acidobacteria* доля филы *Actinobacteria* достоверно возросла в копролитах *L. terrestris* по сравнению с исходной почвой. Аналогичные результаты получены при изучении чер-

вя *L. rubellus* [16]. Многие представители *Actinobacteria* – активные гидролитики. По-видимому, перемешивание и измельчение органических остатков в процессе прохождения почвы и детрита через кишечник дождевых червей способствует снабжению этих бактерий более доступным пищевым субстратом и тем самым активизирует их развитие. Кроме того, многие актинобактерии способны продуцировать антибиотики. Интенсификация развития *Actinobacteria* могла привести к уменьшению в копролитах доли ряда других фил из-за подавления их развития антибиотиками актинобактерий [16].

Обнаружено достоверное увеличение в копролитах *L. terrestris* обилия бактерий филы *Firmicutes* и относящегося к ней семейства *Clostridiaceae*. Представители *Clostridiaceae* – одна из доминирующих групп бактерий в кишечнике и копролитах

**Таблица 2.** Бактериальные таксоны в почве и копролитах *L. terrestris* и *A. caliginosa*, доля представителей которых различалась достоверно (по непараметрическому критерию ТЗ Даннета,  $p < 0.05$ ). Приведены средние арифметические значения  $\pm$  стандартное отклонение. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий между средними значениями обилия для данного таксона в вариантах опыта

Таксон	Почва	Копролиты	
		<i>L. terrestris</i>	<i>A. caliginosa</i>
Филы			
<i>Acidobacteria</i>	11.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	5.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
<i>Actinobacteria</i>	31.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	40.4 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	37.2 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>
<i>Firmicutes</i>	0.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
<i>Gemmatimonadetes</i>	5.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
Классы			
DA052 ( <i>Acidobacteria</i> )	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
<i>Acidobacteria-5</i>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
<i>Acidobacteria-6</i>	2.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>
<i>Acidobacteriia</i>	5.2 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
<i>Chloroflexi</i>	1.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.4 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>
<i>Anaerolineae</i>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Gemm-1 ( <i>Gemmatimonadetes</i> )	1.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
<i>Gemmatimonadetes</i>	3.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
<i>Deltaproteobacteria</i>	5.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	5.1 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>
<i>Pedospaerae</i>	1.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
<i>Actinobacteria</i>	7.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	13.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	13.1 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
<i>Phycisphaerae</i>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
<i>Flavobacteriia</i>	0.04 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
Порядки			
<i>iii 1-15 (Acidobacteria)</i>	2.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>
<i>Acidobacteriales</i>	5.1 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
Ellin6513 ( <i>Acidobacteria</i> )	0.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
<i>Actinomycetales</i>	7.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	13.4 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	13.0 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
<i>Flavobacteriales</i>	0.02 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.1 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<i>Roseiflexales</i>	0.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.3 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
N1423WL ( <i>Gemmatimonadetes</i> )	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
<i>Mycococcales</i>	4.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
<i>Pedospaerales</i>	1.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
Семейства			
<i>Microbacteriaceae</i>	0.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>
<i>Streptomyetaceae</i>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
<i>Sinobacteraceae</i>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.5 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
<i>Micrococcaceae</i>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	1.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
<i>Intrasporangiaceae</i>	0.7 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	1.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
<i>Iamiaceae</i>	0.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
<i>Koribacteraceae</i>	4.7 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
<i>Kouleothrixaceae</i>	0.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
<i>Clostridiaceae</i>	0.02 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
<i>Flavobacteriaceae</i>	0.02 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Роды			
<i>Iamia</i>	0.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
<i>Kribbella</i>	0.1 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
<i>Candidatus Koribacter</i>	3.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
<i>Flavobacterium</i>	0.02 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<i>Pirellula</i>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>

*E. fetida* [17]. Высокая метаболическая активность этих бактерий отмечена в содержимом кишечника *L. terrestris* [26]. Развитию клостридий могут способствовать анаэробные условия в кишечнике дождевых червей, наличие в нем растительных остатков, в деструкции которых задействованы *Clostridiaceae* и другие представители фила *Firmicutes* [25].

Обнаруженное увеличение доли флавобактерий при пассаже почвы через кишечник *L. terrestris* отмечено и у червей *A. trapezoides*, обитающих в почвах Австралии [19]. Кроме того, флавобактерии выделены из кишечного гомогената *A. caliginosa* [18]. Увеличение в кишечнике дождевых червей обилия флавобактерий связывают с их способностью к нитратному дыханию, что позволяет этим бактериям не только адаптироваться к недостатку кислорода, характерному для этой среды обитания, но и успешно конкурировать с микроорганизмами других видов [18].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различия в составе прокариотного комплекса в исходной почве и свежих копролитах дождевых червей изученных видов были относительно невелики, предположительно, из-за непродолжительного по времени прохождения почвы через пищеварительную систему червей. Наиболее масштабные изменения в составе сообщества прокариот отмечены после пассажа почвы через кишечник *L. terrestris*, а не *A. caliginosa*. Возможно, это связано с различиями в пищеварительных системах червей этих видов, приспособленных к трансформации отличающихся по составу источников питания. Черви *L. terrestris* питаются преимущественно опадом, а *A. caliginosa* — более разложившим детритом [4].

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Работа выполнена в рамках темы госзадания № 115122210098-2 “Роль геохимической деятельности почвенных микроорганизмов в поддержании стабильности наземных экосистем”.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Битюцкий Н.П., Кайдун П.И. Влияние дождевых червей на подвижность микроэлементов в почве и их доступность растениям // Почвоведение. 2008. № 12. С. 1479–1486.
2. Битюцкий Н.П., Соловьева А.Н., Лукина Е.И., Лапина И.Н., Власов Д.Ю., Кудряшова Н.В. Влияние дождевых червей различных видов на модификацию популяции микроорганизмов и активность ферментов в почве // Почвоведение. 2005. № 1. С. 82–91.
3. Пономарева С.И. Влияние жизнедеятельности дождевых червей на создание устойчивой структуры дерново-подзолистой почвы // Тр. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 1953. Т. 41. С. 304–376.
4. Стриганова Б.П. Питание почвенных сапрофагов. М.: Наука, 1980. 244 с.
5. Тиунов А.В. Влияние нор дождевых червей *Lumbricus terrestris* на пространственное распределение и таксономическую структуру почвенных сообществ // Экологический журн. 2003. Т. 81. № 2. С. 269–274.
6. Чекановская О.В. Дождевые черви и почвообразование. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 212 с.
7. Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Кутюкова О.Д. Оценка различных индексов разнообразия для характеристики почвенного прокариотного сообщества по данным метагеномного анализа // Почвоведение. 2015. № 4. С. 462–468.
8. Aira M., Bybee S., Perez-Losada M., Dominguez J. Feeding on microbiomes: effects of detritivory on the taxonomic and phylogenetic bacterial composition of animal manures // FEMS Microbiol. Ecol. 2015. V. 91. № 11. P. 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv117>
9. Aira M., Perez-Losada M., Dominguez J. Microbiome dynamics during cast ageing in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* // Appl. Soil Ecol. 2019. V. 139. P. 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.019>
10. Bityutskii N.P., Maiorov E.I., Orlova N.E. The priming effects induced by earthworm mucus on mineralization and humification of plant residues // Eur. J. Soil Biol. 2012. V. 5. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.008>
11. Bityutskii N.P., Kaidun P., Yakkonen K. Earthworms can increase mobility and bioavailability of silicon in soil // Soil Biol. Biochem. 2016. V. 99. P. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.022>
12. Brown G.G., Doube B.M. Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants // Earthworm Ecology. CRC Press, Boca Raton, 2004. P. 213–239.
13. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature Methods. 2010. V. 7. № 5. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
14. Delgado-Balbuena L., Bello-López J.M., Navarro-Noya Y.E., Rodríguez-Valentín A., Luna-Guido M.L., Dendooven L. Changes in the Bacterial Community Structure of Remediated Anthracene-Contaminated Soils // PLOS ONE. 2016. V. 11. № 10. P. 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160991>
15. Fierer N., Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities // PNAS USA. 2006. V. 103. P. 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
16. Furlong M.A., Singleton D.R., Coleman D.C., Whittman W.B. Molecular and Culture-Based Analyses of

- Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. P. 1265–1279. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1265-1279.2002>
17. Hong H.N., Rumpel C., Henry des Tureaux T., Bardoux G., Billou D., Duc T.T., Jouquet P. How do earthworms influence organic matter quantity and quality in tropical soils? // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 43. P. 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.033>
  18. Horn M.A., Drake H.L., Schramm A. Nitrous Oxide Reductase Genes (nosZ) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are Phylogenetically Similar // Appl. Environ. Microbiol. 2006. P. 1019–1026. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1019-1026.2006>
  19. Menezes de A.B., Prendergast-Miller M.T., Macdonald L. M., Toscas P., Baker G., Farrell M., Wark T., Richardson A. E., Thrall P.H. Earthworm-induced shifts in microbial diversity in soils with rare versus established invasive earthworm populations // FEMS Microbiol. Ecol. 2018. V. 94. P. 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy051>
  20. Natal-da-Luz T., Lee I., Verweij R.A., Morais P.V., Van Velzen M.J.M., Sousa J.P., Van Gestel C.A.M. Influence of earthworm activity on microbial communities related with the degradation of persistent pollutants // Environ. Toxicol. 2012. V. 31. № 4. P. 794–803. <https://doi.org/10.1002/etc.1738>
  21. Pass D.A., Morgan A.J., Read D.S., Field D., Weightman A.J., Kille P. The effect of anthropogenic arsenic contamination on the earthworm microbiome // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. № 6. P. 1884–1896. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12712>
  22. Satchell J.E. Earthworm ecology: From Darwin to Vermiculture. London: Chapman and Hall, 1983.
  23. Scheu S., Schlitt N., Tiunov A.V., Newington J.E., Jones H.T. Effects of the presence and community composition of earthworms on microbial community functioning // Oecologia. 2002. V. 133. № 2. P. 254–260. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1023-4>
  24. Shweta Ms. Cellulolysis: A transient property of earthworm or symbiotic/ingested microorganisms? // Int. J. Scien. Res. Publ. 2012. V. 2. № 11. P. 1–8.
  25. Singleton D.R., Hendrix P.F., Coleman D.C., Whitman W.B. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta) // Soil Biol. Biochem. 2003. V. 35. P. 1547–1555. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00244-X)
  26. Wüst P.K., Horn M.A., Drake H.L. Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content // ISME. 2011. V. 5. № 1. P. 92–106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.99>

## Prokaryotic Complexes of Coprolites of *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris*

V. Yu. Shakhnazarova<sup>1,2</sup>, A. V. Yakushev<sup>3,\*</sup>, K. L. Yakkonen<sup>1</sup>, A. A. Kichko<sup>2</sup>,  
T. S. Aksenova<sup>2</sup>, and N. P. Bityutskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup>St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199178 Russia

<sup>2</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, sh. Podbel'skogo, 4, Pushkin-8, St. Petersburg, 196608 Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: a\_yakushev84@mail.ru

For the first time, a comparative study of the influence of two species of earthworms (*Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris*) on the composition of the prokaryotic complex of Umbric Albeluvisols was carried out using the methods of metagenomics. Prokaryotes in the soil and coprolites were mainly represented by Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. The passage of soil through the earthworm intestines significantly changed the abundance of some taxa in the soil prokaryotic block, but not general indicators of its biodiversity. In the coprolites of earthworms of both species, a decrease in the abundance of Acidobacteria and Gemmatimonadetes phyla, including predominantly oligotrophic bacteria, was recorded. Coprolites of *L. terrestris* were characterized by an increase in the proportion of Actinobacteria and Firmicutes phyla, which are mainly represented by copiotrophs and hydrolytics. In addition, the abundance of Clostridiaceae anaerobic bacteria and *Flavobacterium* capable of nitrate respiration increased in the casts of *L. terrestris*, probably due to the appearance of anaerobic conditions in the biogenically transformed soil. Generally, changes in the taxonomic structure of prokaryotes in the soil treated by *L. terrestris* were greater than those in the soil treated by *A. caliginosa*. These differences among casts of different earthworm species could be due to the specificity of functioning of their digestive systems adapted to transformation of different food sources.

**Keywords:** taxonomic composition, intestinal community, bacteria, taxonomic biodiversity