УДК: 633.31;579.64; 573.22

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ИЗМЕНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОФЛОРЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПОЧВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЗАСУХИ

С.И. Лоскутов[1], Я.В. Пухальский[1,2], А.И. Шапошников[2], Н.И. Воробьев[2], А.А. Белимов[2]

[1]ООО НПО «БиоЭкоТех», Санкт-Петербург, Россия
[2]ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург – г. Пушкин, Россия

Введение. Почва является самым обширным депозитарием микробных сообществ как прокариотного, так и грибного комплекса на Земле. Разные типы и фациальные подтипы, известные на данный момент в иерархии почв [11, 14], в той или иной степени влияют на различия в частотно-таксономической структуре микроорганизмов и показателях альфа- и бета-биоразнообразия. Частотно-таксономический бонитет обуславливается совокупностью всех свойств конкретной почвы: физическими, водно-физическими, физико-химическими, генезисом, гранулометрическим и агрегатным составом, а также предшествующими микробиологическими биохимическими процессами. Кроме того, при изучении микробных сообществ ризосферного участка почвы немаловажным фактором может также является обилие растительных формаций и состав их корневых выделений (экзометаболитов), главным образом низкомолекулярных органических кислот [7, 9, 10, 20, 22, 23, 26].

Известно, что одной из главных причин недобора урожаев сельскохозяйственных культур во всем мире является засуха. Она же может негативно влиять и на структуру микробных сообществ. При этом, почвенная микрофлора, как наиболее чувствительная к любым изменениям биогеоценоза система, в данном аспекте выступает индикатором состояния плодородия и «здоровья почв» [1, 12, 15, 17, 18]. Именно сбалансированное частотное и таксономическое разнообразие микроорганизмов определяет самоочищающую (санационную) и супрессивную активность почвенного фитопедоценоза [1, 17].

Культивация микроорганизмов на селективных средах позволяет исследовать порядка 1% от общего числа микроорганизмов в почве. Остальные 99% популяций не культивируются на известных селективных средах [24, 25]. Поэтому, благодаря появлению и активному развитию за последние 20 лет в области молекулярной экологии новейших молекулярно-генетических методов, в частности технологии высокопроизводительного пиросеквенирования [27, 29, 30], микробиология получила возможность анализа структурных изменений в почвенных микробных сообществах в полном их геномном биоразнооообразии - *микробиоме*, отражающем весь пул микроорганизмов.

К настоящему моменту времени, большая доля расходов в научных исследованиях, связанна не с собственно процессом секвенирования, а с анализом полученных данных.

Порядка 60% почвенного микробиома ассоциировано с органо-минеральным гумусовым горизонтом почвы, сорбирующего в себе большую часть клеток микробов на поверхности твердой фазы агрегатов [8, 31]. Связь структурных перестроек микробных сообществ с внешними условиями и применением агротехнологий ещё мало исследована и может привести к полному переосмыслению всей современной научной парадигмы в почвенной микробиологии [13, 16].

Для наиболее полного раскрытия экологических и сервисных функций микробиома почв некоторые исследователи предлагают сочетать методы метагеномики (для оценки филогенетического разнообразия микроорганизмов), с анализом биомаркеров (для определения функционального разнообразия) и измерений ферментативной активности (для оценки актуальной функциональности почв) [21].

Поскольку почва является лабильной средой, способной непрерывно и кардинально меняться в течении краткосрочных (сезонных, годовых) и более длительных (десятки и

сотни лет) периодов времени, перспективой данного направления, при условии масштабного и долгосрочного «хроно-скрининга» основных типов почв с учетом изменений экологических факторов внешней среды, может быть создание крупнейшей в мире интерактивной (визуальной) геоинформационной базы данных, для разработки эффективных алгоритмов и многофакторных моделей прогнозирования и поддержания существующего уровня плодородия в адаптивно-ландшафтных системах земледелия той или иной местности региона [19]. Разумеется, столь масштабная работа не может быть проведена без тесного сотрудничества специалистов из разных областей наук [6, 28].

Методика. Нами был проведен модельный вегетационный эксперимент в горшках с залежной дерново-подзолистой почвой. Растительными объектами для исследования послужили дикая линия гороха посевного (*Pisum sativum* L.) – SGE, и созданный на ее основе толерантный к кадмию мутант – SGECdt [33]. В опыте были использованы два режима полива: 40 % (засуха) и 80 % (норма) влажности. Частота полива (ирригации) составила один раз в двое суток.

Согласно разработанной методике [2], в конце опыта из ризосферной почвы растений была выделена бактериальная ДНК, проведена её очистка от ГК и ФК, ПЦР-анализ и дальнейший сиквенс.

Компьютерную обработку полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей, осуществляли согласно методическим рекомендациям в приложении Ribosome Database Project (RDP). Далее проводили классификацию последовательностей на OTU (Operational Taxonomic Unit) с использованием критерия 97 % сходства. Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек осуществляли с помощью программы QIIME.

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы анализа данных R 3.1.1. Использовались модули дисперсионного анализа ANOVA с учетом межгрупповых различий при помощи критерия Tukey post hoc test. Для каждого варианта при расчётах использовалась четырехкратная повторность.

Результаты. Исследования показали, что в условиях искусственно созданной засухи в результате адаптационных процессов в структуре микробного сообщества среди остального таксономического разнообразия начинают преобладать бактерии определенных видов. Так, например, филы *Actinobacteria, Acidobacteria и Gemmatimonadetes* имели большую долю при нормальном водном режиме полива - 27, 7 и 5%. В микробиоме почв при засухе они составили соответственно - 8, 2 и 1%. Фила *Proteobacteria*, обладает меньшей представленностью в нормальных условиях (44%), а наибольшую долю (80%) при влиянии засухи (рис. 1).

Эти явления, по нашему мнению, связанны с разной динамикой питательных веществ в почве. В засушливом варианте опыта более интенсивно развивались микроорганизмы, использующие минеральный азот, а в увлажненном – остальные группы микрофлоры. Таким образом, выявляется определенная зависимость между содержанием доступных элементов питания растений и деятельностью микроорганизмов.

Можно также выделить несколько фил, на которые в с сообществе приходилось около 1% - это *Crenarcheota, Verrucomicrobia, Bacteroidetes*. Численность микроорганизмов из остальных фил в сообществах не достигала 1%. При рассмотрении сообщества на уровне рода в филе *Proteobacteria* доминировали представители *Alphaproteobacteria* (их содержание варьировало в пределах 11-37%), *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas sp*., а также не идентифицируемые до рода представители класса *Proteobacteria*. В филе *Actinobacteria* большую долю занимали роды микроорганизмов из класса *Thermoleophilia, Acidimicrobiia, Solibacteres*. Большинство представителей филы *Firmicutes* составляли не идентифицированные до рода микроорганизмы из классов *Bacilli* и *Clostridia* (рис. 2). Большинство представителей данной филы образуют споры, основная функция которых – обеспечение выживания бактерий в период высокой нагрузки на окружающую среду [32], что в нашем исследовании представляет влияние засухи.

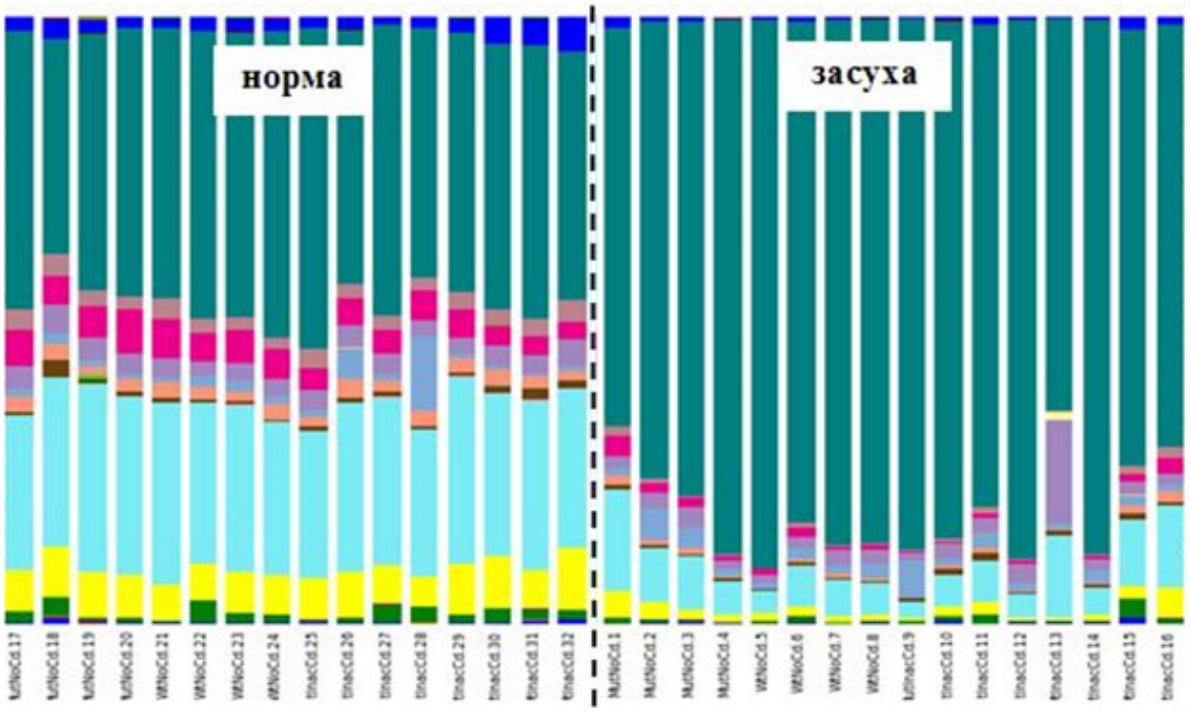

Рисунок 1. Таксономическая структура (на уровне фил) прокариотных сообществ.

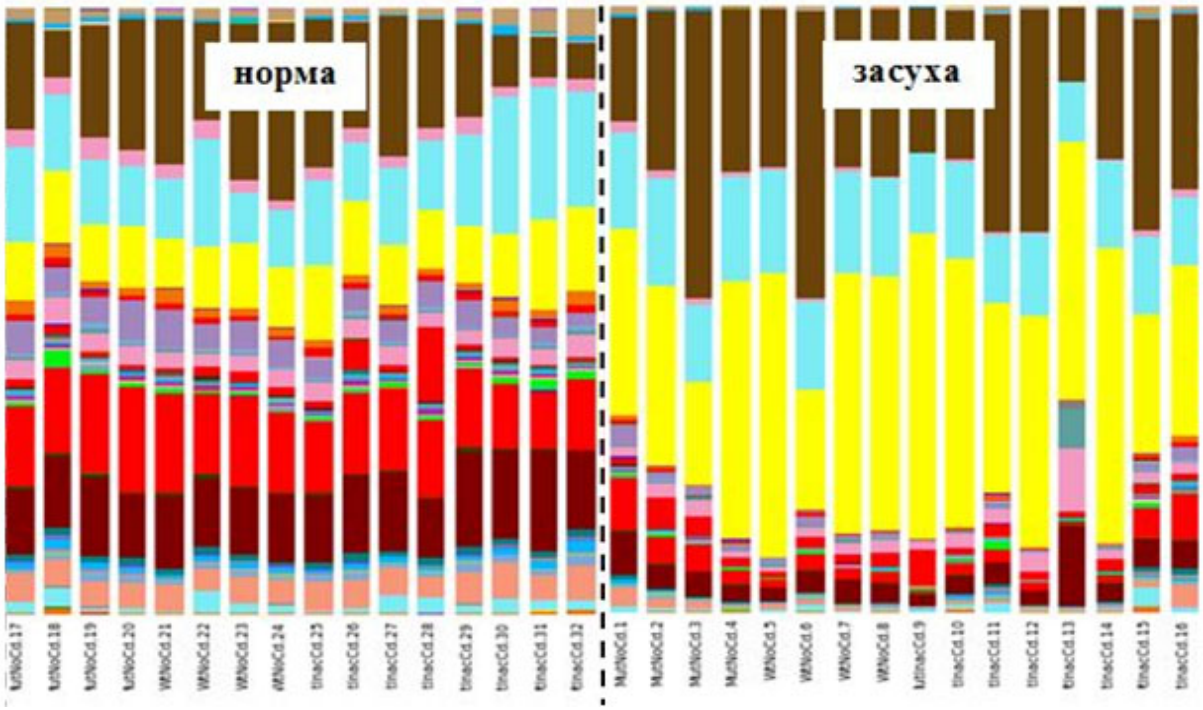

Рисунок 2. Таксономическая структура (на уровне классов) прокариотных сообществ.

Обсуждения и выводы. Следует отметить, что данные результаты являются пока предварительными и отображают изменения в структуре ризосферного сообщества лишь в течении одного летнего сезона и не могут быть интерпретированы как единственно верные и достоверные для последующих лет. Поэтому, для получения более верифицированной и репрезентабельной выборки необходимо продолжать вести дальнейшие длительные исследования, связанные с постановкой экспериментов со стабильным воспроизведением стрессора и всех прочих сопутствующих условий из года в год. Идеальным местом для проведения подобных исследований, позволяющим оптимизировать и стабилизировать множество параметров в комбинаторике факторов внешней среды может послужить селекционный фитотрон, являющий приоритетным для РФ направлением развития генетики и селекции в сельском хозяйстве [5].

Учитывая фактор неоднородности микроклиматических условий тепличного опыта, здесь помимо использования статистических методов (регрессии и корреляции), для поиска возможных переменных, детерминирующих структуру микробного разнообразия в зависимости от флуктуации параметров среды, может быть также применен спектральный анализ деривационных шагов и поиска точек бифуркации и аттракторов, возникающих в системе благодаря теории вторжения фрактального хаоса [3]. Опосредованные связи между экологическими ситуациями в почвах и частотно-таксономическими молекулярно-генетическими данными почвенных микробных сообществ могут быть установлены, используя фрактальные портреты микробных сообществ и фрактальные модели почвенных микробных биосистем [4].

Работа выполнена при поддержки гранта РНФ 14-26-00094.

Список литературы

1. Андронов Е.Е., Иванова Е.А., Першина Е.В., Орлова О.В., Круглов Ю.В., Белимов А.А., Тихонович И.А. Анализ показателей почвенного микробиома в процессах, связанных с почвообразованием, трансформацией органического вещества и тонкой регуляции вегетационных процессов // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2015. № 80. С. 83-94.
2. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. СПб.: Объединение Вента, 2011. 23 с.
3. Богатых Б.А. Фрактальная природа живого: Системное исследование биологической эволюции и природы сознания. М.: Книжный дом «Либроком», 2012. 256 с.
4. Воробьев Н.И., Свиридова О.В., Патыка Н.В., Думова В.А., Мазиров М.А., Круглов Ю.В. Фрактально-таксономический портрет микробного сообщества как биондикатор вида почвенных деструктивных процессов. Сб. Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред». Москва 4-6.02.2013. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. С. 38.
5. Драгавцев В.А. Новая система регуляции у растений и необходимость создания селекционного фитотрона в РФ // Журнал технической физики. 2018. № 88 (9). С. 1331-1335
6. Иванов А.Л. Почвенный покров России: состояние, информационный ресурс, исследовательские задачи и прикладные проблемы (к 100-летию академика Г.В. Добровольского) // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2016. № 82. С. 139–155.
7. Иванов В.П. Растительные выделения и их значение в жизни фитоценозов М.: Наука. 1973. С. 294.
8. Кисленко В.Н. Адсорбция бактерий почвой и ее эпидемиологическое значение. М.: ИНФРА-М, 2018. 156 с.
9. Кравченко Л.В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями // Автореф. дисс. д.б.н. / М., 2000. 52 с.
10. Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Львова К.А., Костюк И.И., Ляпунова О.А., Тихонович И.А. Состав корневых экзометаболитов мягкой пшеницы и томата, влияющих на растительно-микробные взаимодействия в ризосфере. Физиология растений. № 58(5). 2011. 781-786.
11. Наумов В.Д. География почв. Общая часть. Изд-во "Проспект", 2017. 276 с.
12. Научно-практическое определение избранных параметров здоровья почвенной экосистемы (почвы): Учебное пособие. М.: ГУЗ, 2018. 54 с.
13. Першина Е.В., Иванова Е.А., Нагиева А.Г., Жиенгалиев А.Т., Чирак Е.Л., Андронов Е.Е., Сергалиев Н.Х. Сравнительный анализ микробиомов природных и антропогенно-нарушенных почв северо-западного Казахстана. Почвоведение. №6. 2016. С. 720-732.
14. Почвоведение, Ч. 2. Типы почв, их география и использование. (ред. Ковда В.А., Розанов Б.Г). Изд-во: Высшая школа, 1988. 368 с.

15. Семенов А.М., Соколов М.С. Концепция здоровья почвы: фундаментально-прикладные аспекты обоснования критериев оценки // Агрохимия. 2016. № 1. С. 3-16.

16. Сергалиев Н.Х. Андронов Е.Е. Пинаев А.Г., Какишев М.Г., Захарян Р.А. Использование методов современной метагеномики в оценке микробиоты почв Западно-Казахстанской области. Вестник КазНУ. Сер.биологическая. 2013. №1(57). С. 133-138.

17. Соколов М.С., Дородных Ю.Л., Марченко А.И. Здоровая почва как необходимое условие жизни человека // Почвоведение. 2010. № 7. С. 858-866.

18. Соколов М.С., Марченко А.И. Экологический мониторинг здоровья почвы в системе "ОВОС" (методология выбора критериев оценки) // Агрохимия. 2013. № 3. С. 3-18.

19. Тихонович И.А., Иванова Е.А., Першина Е.В., Андронов А.А. Метагеномные технологии выявления генетических ресурсов микроорганизмов // Вестник Российской академии наук. 2017. Т. 87, № 4. С. 337-341.

20. Тихонович И.А., Л.В. Кравченко, А.И. Шапошников. Корневые выделения как важный фактор формирования наномолекулярных структур ризосферы // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2011. N 1. С. 25-27.

21. Чернов Т.И., Холодов В.А., Когут Б.М., Иванов А.Л. Методология микробиологических исследований почвы в рамках проекта “Микробиом России” Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2017. № 87. С. 100-113.

22. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3 С. 16-22.

23. Шапошников А.И., Пухальский Я.В. Кравченко Л.В. Белимов А.А. Роль корневой экссудации в трофических взаимодействиях растений с ризосферными микроорганизмами. Информ-Навигатор. Спб. 2016. 104.

24. Amann R.I., Ludwing W., Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. 1995. 59(1). P. 143-169.

25. Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2004. 68. P. 669-685.

26. Lu W.L., Cao Y.P., Zhang F.S. Role of root excluded organic acids in mobilization of soil phosphorus and micronutrients // Chinese Journal of Applied Ecology. 1999. 10. P. 379-382.

27. Mardis E.R. Next-Generation DNA Sequencing Methods // Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2008. 9. P. 211-219.

28. Pershina E.V., Andronov E.E., Pinaev A.G., Provorov N.A. Recent advances and perspectives in metagenomic studies of soil microbial communities // Management of Microbial Resources in the Environment. Springer. 2013. P. 141-166.

29. Roesch L.A.M., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A., Farmerie W.G., Triplett E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // The ISME Journal. 2007. 1. P. 283-290.

30. Ronaghi M. 2004. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis // Methods in Molecular Biology. 255. P. 211-219.

31. Saeki K., Kunito T. Adsorptions of DNA molecules by soils and variable-charged soil constituents. In: Méndez-Vilas A (ed) Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex. 2010.

32. Teixeira L.C.R.S., Peixoto R.S., Cury J.C., Sul W.J., Pellizari V.H., Tiedje J., Rosado A.S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica // The ISME Journal. 2010. 4. P. 989-1001.

33. Tsyganov V.E., Belimov A.A., Borisov A.Y., Safronova V.I., Georgi M., Dietz K-J., Tikhonovich I.A. A chemically induced new pea (*Pisum sativum* L.) mutant SGECdt with increased tolerance to and accumulation of cadmium // Annals of Botany. 2007. 99. P. 227-237.