

*На правах рукописи*

**СЕМЕНОВ МИХАИЛ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ**

**БИОМАССА И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА  
АРХЕЙ И БАКТЕРИЙ В ПОЧВАХ  
ПРИРОДНЫХ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Диссертационная работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научный руководитель:** **Степанов Алексей Львович**, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Официальные оппоненты:** **Васильева Лина Васильевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории реликтовых микробных сообществ, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского  
**Ермакова Инна Тихоновна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробной энзимологии, ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Защита диссертации состоится «31» мая 2016 года в 14 час 00 мин в аудитории М-2 на заседании Диссертационного совета Д 501.002.13 при ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д. 1, стр.12, факультет почвоведения.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайтах <http://istina.msu.ru/dissertations/18919340/> и <http://soil.msu.ru/nauka/uchenyj-sovet>

Автореферат разослан «    » марта 2016 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью организации, просьба направлять по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д. 1, стр.12, факультет почвоведения, Учёный совет.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Костина Наталья Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Почвенный биом представляет собой систему прокариотных и эукариотных сообществ со свойственным им филогенетическим и функциональным разнообразием. Прокариоты являются «элементарной единицей и универсальной основой жизни» [Заварзин, Колотилова, 2001]. Примерно 5% от общего количества прокариот на Земле, оцениваемого в пределах  $10^{28}$ - $10^{30}$  организмов, сосредоточено в почве [Prosser et al., 2007; Schmidt, 2006; Whitman et al., 1998]. Прокариотный комплекс включает домены Bacteria и Archaea. Археи – это гетерогенная группа микроорганизмов, отличающаяся от бактерий химической структурой липидов, составляющих цитоплазматическую мембрану, наличием уникальных катаболических путей, способностью функционировать в средах с низкой доступностью энергии [Valentine, 2007]. На долю архей приходится 0.5-3.8% всех прокариот, заселяющих аэробные почвы умеренной зоны климата [Ochsenreiter et al., 2003; Ruppel et al., 2007]. В отдельных исследованиях почвенные археи составляли 12-38% от пула гена 16S рНК [Kemnitz et al., 2007].

Часть процессов, слагающих биогеохимические циклы углерода, азота, серы и железа осуществляются исключительно прокариотами. Почвенные прокариоты выступают агентом трансформации органических остатков, мобилизуют и иммобилизуют макро- и микроэлементы, контролируя их биогеохимический круговорот, участвуют в обмене газов, поддерживают продукционный потенциал наземных экосистем благодаря симбиозам и ассоциациям с растениями [Звягинцев, 1987; Умаров, 1998; Умаров и др., 2007]. Бактериям и археям присущи как сугубо специфические, так и пересекающиеся функциональные характеристики. Частичное перекрытие экологических функций бактерий и архей в биосфере предопределяет необходимость их совместного изучения.

Наряду с классическими методами выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов, определения численности, состава, структуры и активности почвенного микробного сообщества широкое распространение получают новые молекулярно-генетические подходы и способы определения таксономического и функционального разнообразия микроорганизмов. Микроорганизмы, которые не так давно считались «типичными» представителями почв (бациллы, псевдомонады, актинобактерии), при изучении молекулярно-биологическими методами зачастую оказываются малочисленными, а некоторые из недавно открытых групп некультивируемых микроорганизмов – не только повсеместно распространенными, но и доминирующими в почвах [Killham, Prosser, 2007]. Поэтому необходима перепроверка ареалов распространения и экологических ниш микроорганизмов, уточнение природы и механизмов их адаптаций, раскрытие междоменных и межвидовых взаимоотношений.

**Цель исследований.** Количественная оценка содержания ДНК и определение состава и таксономической структуры прокариотного комплекса почв природных и сельскохозяйственных экосистем.

**Задачи исследований:** 1. Определить содержание общей микробной биомассы в черноземе типичном, серой лесной и бурой полупустынной почве на основе количественной экстракции дцДНК.

2. Установить соотношение бактериальной и грибной биомассы в почвах катены методом селективного ингибирования субстрат-индуцированного дыхания.

3. Определить характер внутрипрофильного распределения метаболически активных архей и бактерий и показать зависимость их соотношения от содержания углерода и азота в почве.

4. Выявить таксономическую структуру и доминирующие таксоны в составе архейного и бактериального сообществ почв с использованием молекулярно-биологических методов.

5. Показать специфику состава метаногенного и метанотрофного сообществ почв катены в местах превалирования эмиссии или поглощения метана.

**Научная новизна.** Разработана процедура нового метода оценки микробной биомассы почв на основе количественного определения почвенной дцДНК. С помощью современных молекулярно-биологических методов (FISH, кПЦР, секвенирование) получены закономерности распределения новых таксонов архей и бактерий в почвах природных и сельскохозяйственных экосистем. Впервые показана высокая численность и доминирование родов бактерий, которые ранее не обнаруживались в почвах с помощью традиционных микробиологических методов (*Chtoniobacter flavus*, *Caldithrix palaeochoryensis*, *Pelotomaculum isophthalicum*). С помощью метода секвенирования гена 16S рНК показано, что представители филума *Verrucomicrobia* доминировали в серой лесной почве и черноземе типичном естественных экосистем, а среди видов наиболее представленным был *Chtoniobacter flavus*. Показано, что в метаногенном сообществе почв катены доминируют виды *Methanolobus taylori*, *Methanococcoides methylutens*, *Methanosaeta concilii* и *Methanosaeta pelagica*, а в метанотрофном – *Methylosinus puelana* и *Methylosinus acidophilus*.

**Практическая значимость.** Результаты исследований могут быть использованы при расчете запасов микробного углерода в почвах разных климатических зон, оценке участия почвенных прокариот в углеродно-азотном метаболизме и обмене парниковых газов. Соотношение метаболически активных бактерий и архей предложено использовать в качестве эколого-трофического индекса состояния микробного сообщества почв. Определены таксоны бактерий и архей, наиболее чувствительные к агрогенным воздействиям либо выступающие индикатором обмена метана в почве. Результаты исследований могут быть рекомендованы для использования в спецкурсах по биологии почв и экологии микроорганизмов.

**Апробация работы.** Результаты исследований лично доложены на 17-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013), XX-й Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, 2013), Международной конференции «Генетическая интеграция про- и эукариот:

фундаментальные исследования и современные агротехнологии» (Санкт-Петербург, 2015), Всероссийской конференции с международным участием и школе молодых ученых «Современные методы исследований почв и почвенного покрова» (Москва, 2015), 13th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (Milan, 2015), EGU General Assembly (Vienna, 2015), Ecology of Soil Microorganisms (Prague, 2015).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, обсуждение экспериментальных результатов, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 191 страницах, содержит 13 таблиц, 47 рисунков. Список литературы включает 356 наименований, в том числе 315 англоязычных.

**Декларация личного участия.** Автор работы лично разрабатывал способ количественного измерения микробного углерода в почве по количеству экстрагированного дцДНК, занимался подбором концентраций антибиотиков, обеспечивающих наибольшее подавление субстрат-индуцированного дыхания грибов и бактерий, готовил и проводил микроскопирование препаратов метаболически активных клеток, выполнял анализ данных секвенирования с помощью программного обеспечения Illumina, осуществлял статистическую обработку массива экспериментальных данных, интерпретировал выявленные факты и сопоставлял их с литературными материалами, представлял исследования на научных конференциях, готовил публикации и настоящую рукопись.

**Поддержка и благодарности.** Диссертационная работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Часть экспериментальных материалов получена в рамках проектов, поддержанных Германской службой академических обменов (DAAD program «Forschungsstipendien für Doktoranden und Nachwuchswissenschaftler», 2013-2014 г.), Российским научным фондом (№№ 14-14-00625 и 14-26-00079), Ведущей научной школой (№ НИШ\_6620.2012.4) и Российским фондом фундаментальных исследований (№№ 08-04-92218-ГФЕН\_a и 15-29-02499\_a). Автор выражает признательность и благодарность научному руководителю д.б.н., профессору А.Л. Степанову, д.б.н., профессору Н.А. Манучаровой, д.б.н. Н.Д. Ананьевой, к.б.н. Е.В. Благодатской, к.б.н. И.К. Кравченко, д.с.-х.н. Б.М. Когуту, к.с.-х.н. О.В. Кутовой, к.б.н. Е.А. Ивановой, к.с.-х.н. А.К. Тхакаховой, Т.И. Чернову и А.Д. Железовой за ценные советы при выборе темы и объектов исследований, помощь в проведении экспериментов, обобщении материала и полезные консультации. Большое содействие в формировании исследовательских навыков оказали заведующий кафедрой биологии почв, чл.-корр. РАН И.Ю. Чернов, преподаватели и сотрудники кафедры биологии почв МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор Университета Геттингена Я.В. Кузяков, директор Почвенного института имени В.В. Докучаева академик РАН А.Л. Иванов, родители Н.А. Семенова и д.б.н. В.М. Семенов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРОКАРИОТНОГО ПОЧВЕННОГО СООБЩЕСТВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В четырех разделах главы рассмотрены физиолого-биохимические и экологические различия бактерий и архей, дана современная систематика архей, показаны специфические функции бактерий и архей в глобальных циклах углерода и азота, изложены основные методы определения микробной биомассы и активности почвенных микроорганизмов. Отмечено, что различия между археями и бактериями проявляются на генетическом и биохимическом уровнях. Благодаря особенностям химической структуры липидов ЦПМ, меньшей потребности в энергии для поддержания жизнедеятельности и использованию уникальных катаболических путей, археи получают экологические преимущества в нишах с низкой доступностью энергии и лучше адаптируются в неблагоприятных или экстремальных условиях среды. Обитающие в почве археи представлены филумами *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*, тогда как другие филумы (например, *Korarchaeota* и *Nanoarchaeota*) относятся к редким группам. Приведены примеры участия архей и бактерий в процессах минерализации и ассимиляции углерода, в том числе метаногенеза и метанотрофии, фиксации атмосферного азота, нитрификации и денитрификации. Подчеркивается, что археи обеспечивают трансформацию углерода и азота преимущественно в неблагоприятных для бактерий и экстремальных по условиям природных средах. Проведен подробный анализ наиболее употребляемых в современных исследованиях методов измерения микробной биомассы и общей численности прокариот в почве, оценке их активности, определения структуры и разнообразия прокариотного компонента почвенного микробного сообщества.

### ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований были серая лесная и аллювиально-луговая почвы, образующие катену в пределах склонового ландшафта западной экспозиции правой части бассейна реки Любожиха, правого притока реки Ока (Московская область, Серпуховский район, г. Пущино), типичный чернозем (Воронежская область, Таловский район) и бурая полупустынная почва естественных и сельскохозяйственных экосистем (Астраханская область, Черноярский район). Серая лесная почва соответствовала автономной (залежь свыше 20 лет), транзитной (вторичный лес узколистных пород) и транзитно-аккумулятивной (смешанный лес) части склонового ландшафта, а аллювиально-луговая под лугово-болотной растительностью – аккумулятивной части [Семенов и др., 2010]. Образцы серой лесной и аллювиально-луговой почв отбирали из трех горизонтов до глубины 70 см, чернозема типичного (лесополоса и пашня) – из двух слоев горизонта А1 и из горизонта АВ до глубины 70 см, бурой полупустынной почвы (целинное разнотравье и пашня) – из шести горизонтов (А, АВ, В, ВС, С1 и С2) до глубины 140 см.

Физико-химические свойства почв катены зависели как от местоположения, так и от типа доминирующей растительности. Наибольшее содержание  $C_{орг}$  и  $N_{общ}$  в серой лесной почве было приурочено к верхней

транзитной части ландшафта. Аллювиально-луговая почва отличалась от серой лесной почвы повышенным содержанием  $C_{\text{орг}}$  и  $N_{\text{общ}}$  и нейтральной реакцией среды. Содержание  $C_{\text{орг}}$  в профиле чернозема типичного колебалось в диапазоне от 4.65 до 2.54%,  $N_{\text{общ}}$  – от 0.35 до 0.21% от массы почвы, уменьшаясь с глубиной. Различия в содержании  $C_{\text{орг}}$  и  $N_{\text{общ}}$  в черноземе под лесополосой и пашней наблюдались в основном в верхнем горизонте, тогда как в более глубоких слоях нивелировались. Бурая полупустынная почва отличалась крайне низкой обеспеченностью  $C_{\text{орг}}$  и  $N_{\text{общ}}$  и щелочной реакцией среды, особенно в нижних горизонтах профиля.

Общую микробную биомассу в почве определяли методом субстрат-индуцированного дыхания [Anderson, Domsch, 1978] и фумигации-экстракции [Vance et al., 1987; Joergensen, 1996]. Для определения доли грибов и бактерий в биомассе почв методом селективного ингибирования субстрат-индуцированного дыхания (СИД) использовали стрептомицина сульфат и циклогексимид, которые вносили в почву по отдельности, устанавливая изменения в СИД (Семенов и др., 2013).

Почвенную ДНК экстрагировали из образцов массой 0.5 г с помощью FastDNA® SPIN kit for Soil (MP Biomedicals, Germany) согласно протоколу производителя. Количественное определение дцДНК проводилось путем 150-кратного разбавления экстрактов ДНК, выделенных из почвы, в растворе ТЕ-буфера (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) и измерения активности флуоресценции на автоматическом флуорометре (Wallac 1420, Perkin Elmer, Turku, Finland). Для пересчета дцДНК в  $C_{\text{мик}}$  использовали коэффициент 5.10, полученный экспериментальным путем. Численность метаболически активных клеток бактерий и архей определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [Манучарова, 2008]. Филогенетические группы в составе домена Archaea определялись с помощью специфических проб CREN537 (5'-TGA CCA CTT GAG GTG CTG -3'), EURY806 (5'-CAC AGC GTT TAC ACC TAG -3') и THAUM494 (5'-GAA TAA GGG GTG GGC AAGT -3'), соответствующих филумам *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota*. Количественный учет ДНК бактерий и архей проводили методом ПЦР в реальном времени в амплификаторе iCycler (Biorad) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле. В качестве стандартов для бактерий использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона *Escherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*.

Родовой и видовой состав, а также относительная численность отдельных таксонов почвенных архей и бактерий могут быть определены с помощью метода высокопроизводительного секвенирования последовательностей гена 16S рРНК из образцов тотальной почвенной ДНК. Амплификацию регионов V3-V4 гена 16S рРНК проводили с использованием универсальных прямого и обратного праймеров:

16S ампликонный ПЦР прямой праймер=5'

TTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S ампликонный ПЦР обратный праймер=5'  
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCT  
AATCC.

После получения ампликонов библиотеки были очищены и смешаны эквимольно с помощью SequalPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01). Результирующий пул библиотек был проверен на капиллярном электрофорезе. Пул библиотек образцов серой лесной и аллювиально-луговой почв был секвенирован на Illumina MiSeq (251 цикл с каждой стороны фрагментов) с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения MiSeq Reporter (Illumina). Для определения таксономической структуры микробиомов черноземов использовались универсальные праймеры к варибельному участку V4 гена 16S рНК – F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) [Bates et al., 2011]. Подготовку проб и секвенирование выполняли на приборе GSJunior (“Roche”, Швейцария) согласно рекомендациям производителя. Результаты анализа метагеномных данных для каждого образца выполнены в программном обеспечении MiSeq Reporter Metagenomics workflow (Illumina), а также с использованием программного пакета QIIME.

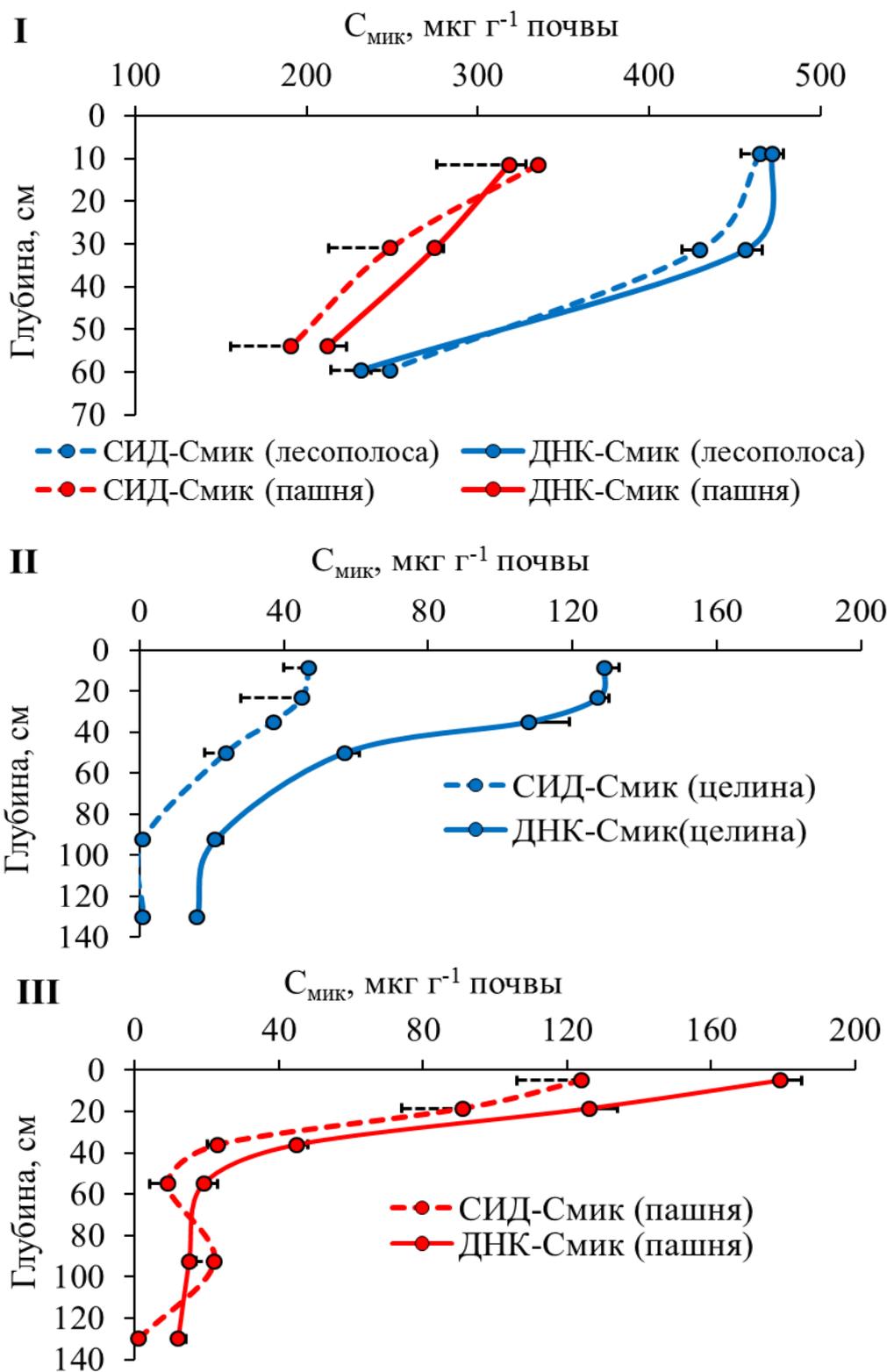
Определение скорости потока метана *in situ* проводили методом закрытых камер, отбирая газовые пробы дважды летом и один раз осенью [Семенов и др., 2010]. Чтобы определить вклад разных слоев верхнего горизонта почв катены в поток метана, отбор газа производили с открытой поверхности почвы и с поверхности, зачищенной на глубине 10 и 20 см после удаления 0-10 и 0-20 см слоев соответственно. Концентрацию метана в газовых пробах определяли на газовом хроматографе Кристалл 5000.1 (Россия). Величины потоков метана рассчитаны исходя из изменения его концентрации в закрытой камере за период экспозиции

Статистическая обработка результатов выполнена в программе Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK), графическое оформление – с помощью пакета Excel. Из-за разного количества горизонтов и численных различий в массивах данных использовали корреляционный коэффициент Спирмена. Анализы, связанные с построением нелинейных регрессий, были выполнены с использованием программного обеспечения SigmaPlot 4.0.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **3.1. ИЗМЕРЕНИЕ ОБЩЕЙ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПОЧВЕННОЙ ДНК**

Методы субстрат-индуцированного дыхания (СИД) и фумигации–экстракции (ФЭ) широко используются при определении общей микробной биомассы в почве. Однако, каждому из этих методов свойственны известные ограничения, обусловленные как особенностями присущих им процедур, так и спецификой физико-химических свойств разных почв. В этом случае количественное определение двухцепочечной ДНК (дцДНК), экстрагированной из почвенных микроорганизмов, может быть удобным и эффективным способом измерения микробной биомассы.



**Рис. 1.** Содержание углерода микробной биомассы в профиле чернозема типичного (I) и бурой полупустынной почвы (II и III), измеренное методами количественного определения дцДНК и субстрат-индуцированного дыхания (СИД).

Содержание общей дцДНК в черноземе типичном соответствовало углероду микробной биомассы, измеренному методом СИД (СИД- $C_{\text{мик}}$ ), при коэффициенте пересчета дцДНК в ДНК- $C_{\text{мик}}$  ( $F_{\text{ДНК-СИД}}$ ) равном 5.10, значение которого совпадало с установленным в других исследованиях [Anderson,

Martens, 2013; Joergensen, Emmerling, 2006]. В бурой полупустынной почве в связи с общим низким содержанием микробной биомассы, а также по причине сорбции  $\text{CO}_2$  при  $\text{pH} > 8$  субстрат-индуцированное дыхание в глубоких горизонтах не детектировалось, тогда как дцДНК количественно измерялось (рис. 1). Количество экстрагированной в черноземе типичном и бурой полупустынной почве дцДНК коррелировало и с  $\text{ФЭ} \cdot \text{C}_{\text{мик}}$  при коэффициенте пересчета в  $\text{ДНК} \cdot \text{C}_{\text{мик}}$  ( $\text{F}_{\text{ДНК-ФЭ}}$ ) равном 4.41, величина которого соответствовала диапазону значений, полученных в других работах [Gong et al., 2001; Marstorp, Witter, 1999]. Превышение пересчетного коэффициента  $\text{F}_{\text{ДНК-СИД}}$  над  $\text{F}_{\text{ДНК-ФЭ}}$  в 1.156 было связано скорее с недоучетом микробной биомассы методом ФЭ, чем с завышенной оценкой  $\text{C}_{\text{мик}}$  по методу СИД, поэтому для всех исследуемых почв было рекомендовано использовать стандартный коэффициент пересчета дцДНК на  $\text{C}_{\text{мик}}$ , равный 5.10.

Метод количественной экстракции дцДНК давал реальные величины содержания  $\text{C}_{\text{мик}}$  в почвах разных типов и экосистем. В верхнем горизонте серой лесной почвы автономного и транзитного участков склонового ландшафта под залежью и широколиственным лесом соответственно содержалось 302 и 453 мкг/г дцДНК- $\text{C}_{\text{мик}}$ , в аллювиально-луговой почве аккумулятивной позиции ландшафта под луговой растительностью – 840, в горизонтах А1 и Апах чернозема типичного под лесополосой и пашней – 465 и 318, а в горизонтах А и Апах бурой полупустынной почвы под целиной и пашней – 129 и 179 мкг/г. Во всех почвах разных местоположений наблюдалось существенное уменьшение содержания дцДНК- $\text{C}_{\text{мик}}$  вниз по профилю (рис. 1). В серой лесной почве автономной и транзитной части ландшафта на глубине 40-70 см содержалось в 4.8 и 12.9 раз меньше дцДНК- $\text{C}_{\text{мик}}$ , чем в слое 0-15 см, а в аллювиально-луговой почве аккумулятивной части – соответственно в 4.5 раза. В черноземе типичном под лесополосой и пашней в переходном горизонте АВ количество дцДНК- $\text{C}_{\text{мик}}$  было соответственно в 1.9 и 1.5 раза меньше, чем в верхней части гумусового горизонта. В бурой полупустынной почве под целинной растительностью и пашней содержание  $\text{C}_{\text{мик}}$  резко уменьшалось с глубиной до 45-57 и 12-16 мкг/г.

Соотношение  $\text{C}_{\text{мик}}:\text{C}_{\text{орг}}$  в гумусовых горизонтах сужалось в следующей последовательности исследуемых почв: бурая полупустынная (пашня) > бурая полупустынная (целина) > серая лесная (залежь) > серая лесная (лес) > аллювиально-луговая (пойменный луг) > чернозем типичный (лесополоса) > чернозем типичный (пашня). В нижних горизонтах почв соотношение  $\text{C}_{\text{мик}}:\text{C}_{\text{орг}}$  было существенно ниже, чем в верхнем гумусовом горизонте. Сужение отношения  $\text{C}_{\text{мик}}:\text{C}_{\text{орг}}$  в почве указывает на усиление прочности стабилизации органического субстрата или на наличие экологических условий и физических барьеров, препятствующих его освоению микроорганизмами [Anderson, 2003; Anderson, Domsch, 1989].

Таким образом, количественное определение дцДНК является эффективным способом измерения общей микробной биомассы в разных почвах, в том числе в щелочных и с высоким содержанием карбонатов. Существуют строгие и постоянные соотношения между содержаниями в почве дцДНК и микробной биомассы, определяемой методами СИД и ФЭ,

позволяющих использовать их в качестве коэффициентов пересчета дцДНК в общую микробную биомассу почвы.

### **3.2. СООТНОШЕНИЕ ГРИБНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ В ПОЧВЕ**

Соотношение грибы/бактерии в микробном сообществе является одним из индикаторов процессов разложения субстратов, трансформации питательных элементов, чувствительности почвенных экосистем к нарушающим воздействиям и способности к саморегуляции [Bailey et al., 2002; Van der Heiden et al., 2008]. В наших исследованиях предусматривалось оптимизировать процедуру разделения вклада грибов (Г) и бактерий (Б) в общую микробную биомассу почвы методом селективного ингибирования антибиотиками субстрат-индуцированного дыхания и определить особенности соотношения Г/Б в почвах разных частей ландшафта, представленных разными экосистемами (залежь, лес, луг). Было установлено, что концентрация стрептомицина должна корректироваться с учетом рН почвы и для наибольшего подавления СИД почвы с рН 6-7 требуется меньшая его концентрация ( $< 1$  мг/г), чем таковая в почве с рН 5.0-5.5. В случае использования циклогексимида доказана необходимость добавления талька в соотношении 1:1 в качестве инертного наполнителя для лучшего распределения препарата в почве, и, следовательно, большего угнетения СИД. Кроме того, было важно подобрать для каждой почвы в пределах катены оптимальные концентрации стрептомицина и циклогексимида, обеспечивающие «удовлетворительные» значения коэффициента перекрывания активностей антибиотиков и, соответственно, наибольшее подавление СИД. Решив три эти задачи, были получены уточненные соотношения грибов и бактерий в микробной биомассе почв, залегающих на территории склонового ландшафта.

Оказалось, что вклад грибов в общее СИД был доминирующим (82-97%), а бактерий – всего 9-20% от суммарного. В транзитной и транзитно-аккумулятивной частях ландшафта вклад грибов в общее дыхание был меньше (82-87%), чем в автономной и аккумулятивной точках катены (91-97%). Главными почвенными факторами, влияющими на соотношение Г/Б в микробной биомассе, были С/Н почв и их рН ( $r = 0.61$  и  $0.57$ , соответственно).

Таким образом, в пределах сопряженного ряда естественных экосистем, свойственных склоновому ландшафту, проявляется отчетливая пространственная изменчивость распределения биомассы бактерий и грибов. Чем уже соотношение С/Н в почве, тем выше доля бактериального компонента в микробной биомассе почв. Биомасса грибов была более чувствительна к рН почвы, чем биомасса бактерий.

### **3.3. СТРУКТУРА МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОКАРИОТНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧВ**

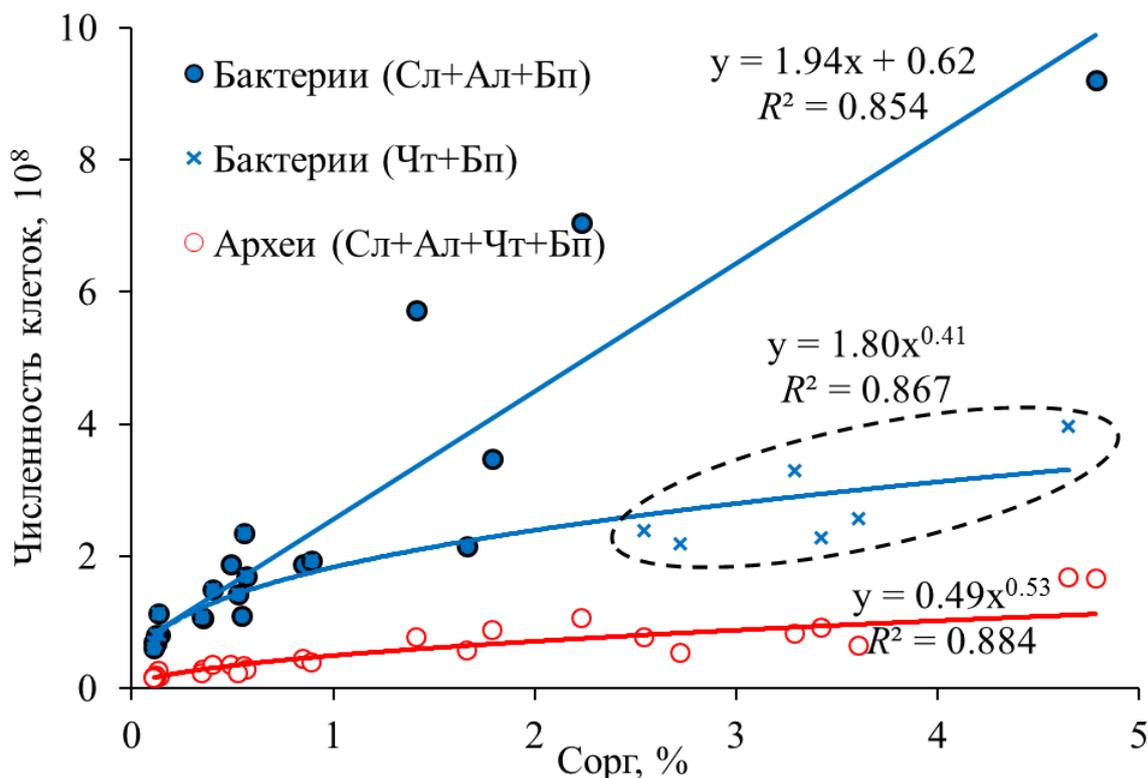
Метод *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными пробами (FISH) совмещает возможности идентификации, визуализации, а также определения численности метаболически активных клеток отдельных филогенетических и

функциональных групп архей и бактерий в различных природных объектах, в том числе в почвах [Манучарова, 2008; Манучарова и др., 2011; Amann, Ludwig, 2000; Schmidt, Eickhorst, 2014].

**Содержание метаболически активных архей и бактерий в серой лесной, черноземе типичном и бурой полупустынной почве.** Количество метаболически активных клеток бактерий в верхнем слое гумусового горизонта варьировало от  $1.92 \times 10^8$  до  $7.05 \times 10^8$ , отчетливо уменьшаясь в следующем ряду почв: аллювиально-луговая (аккумулятивная часть склонового ландшафта) > серая лесная (транзитная часть) > серая лесная (автономная часть) > чернозем типичный (лесополоса) > чернозем типичный (пашня) > бурая полупустынная (целина) > бурая полупустынная (пашня). Число активных клеток архей было примерно на порядок меньше, чем бактерий, а последовательность уменьшения в ряду почв была иной: чернозем типичный (лесополоса) = аллювиально-луговая (аккумулятивная часть склонового ландшафта) > серая лесная (транзитная часть) > серая лесная (автономная часть) > чернозем типичный (пашня) > бурая полупустынная (пашня) > бурая полупустынная (целина). Меньшее число активных клеток бактерий и отчасти архей в типичном черноземе по сравнению с серой лесной почвой могло быть обусловлено недостаточным снабжением микроорганизмов органическим углеродом в черноземе из-за большей защищенности органического вещества, так и частичным недоучетом клеток из-за сложности их отделения от глинистых частиц и гуминовых веществ. Для всех исследуемых почв было характерным уменьшение количества метаболически активных клеток архей и бактерий с глубиной. В почвах агроэкосистем содержалось меньше метаболически активных клеток бактерий, чем в почвах естественных угодий, тогда как влияние обработки почвы на археи проявлялось неоднозначно: сельскохозяйственное использование как снижало их численность, так и не оказывало значимого влияния. Из полученных результатов следует, что численность метаболически активных архей и бактерий в почве природных и сельскохозяйственных экосистем определяется не столько самим фактом наличия агрогенной нагрузки, а тем, какие экологические и почвенные параметры при этом изменяются, и насколько существенно их изменение.

**Зависимость внутрипрофильного распределения архей и бактерий от химических свойств почвы.** Внутрипрофильное распределение численности активных клеток архей и бактерий в разных горизонтах почв естественных и сельскохозяйственных экосистем было подобным распределению органического углерода ( $C_{орг}$ ). Это подтверждается тесной корреляцией между содержанием  $C_{орг}$  в горизонтах серой лесной и аллювиально-луговой почв катены и численностью активных клеток архей ( $r = 0.924$ ,  $n=9$ ) и бактерий ( $r = 0.873$ ,  $n=9$ ). Если сопоставить зависимость числа клеток от содержания  $C_{орг}$  для массива серой лесной, аллювиально-луговой и бурой полупустынной почв с таковой для чернозема типичного и бурой полупустынной почвы, то можно сделать вывод, что органическое вещество чернозема является менее доступным субстратом для активных бактерий по сравнению с другими почвами (рис. 2). Коэффициенты регрессии в уравнениях зависимости численности активных клеток архей от содержания  $C_{орг}$  оказались в 3.6-5.5 раз

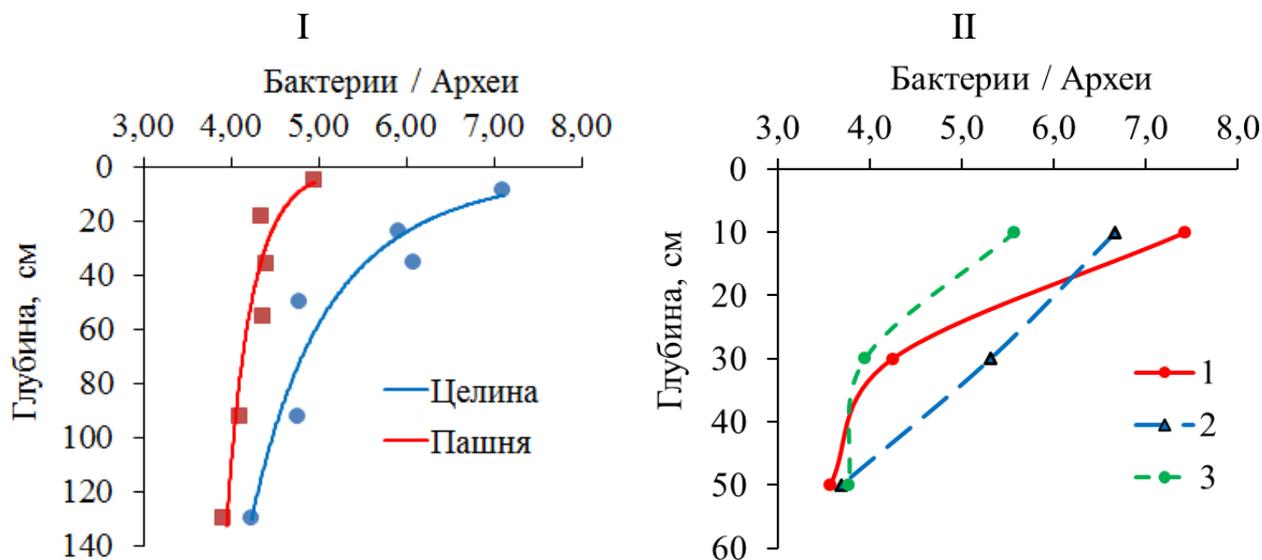
меньше, чем для бактерий, что свидетельствует о меньшей чувствительности архей к обеспеченности субстратом.



**Рис. 2.** Изменение численности метаболически активных клеток бактерий и архей в почве в зависимости от содержания органического углерода ( $C_{орг}$ ). Примечание: Сл – серая лесная почва, Ал – аллювиально-луговая, Чт – чернозем типичный, Бп – бурая полупустынная.

Содержание  $N_{общ}$  в исследуемых почвах также коррелировало с численностью архей ( $r=0.910$  при  $n=18$  и  $r=0.949$  при  $n=9$ ) и бактерий ( $r=0.900$  при  $n=18$  и  $r=0.875$  при  $n=9$ ) и являлось фактором поддержания их активного метаболизма. Так как численность обоих доменов достоверно увеличивалась с расширением отношения  $C/N$  в почве, количество метаболически активных клеток архей и бактерий определялось в большей мере содержанием  $C_{орг}$ , а не азота. Хотя численность активных клеток архей и бактерий достоверно и с одинаковыми коэффициентами ( $r=-0.890$ ,  $n=18$ ) коррелировала с рН типичного чернозема и бурой полупустынной почвы, интервал рН почв не достаточен для окончательного вывода о влиянии этого фактора на изменение численности клеток архей и бактерий.

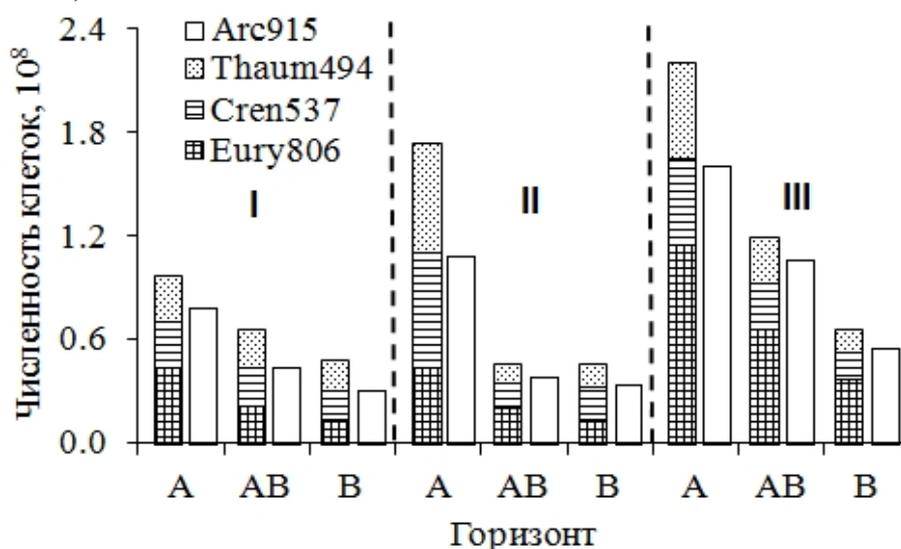
Поскольку содержание  $C_{орг}$  уменьшается с глубиной, а бактерии хуже приспособлены к условиям дефицита углерода по сравнению с археями, соотношение бактерии/археи в бурой полупустынной почве сужалось от 7.1 в верхнем горизонте до 3.7 на глубине 120-140 см, а в почве пашни – от 5 до 3.5 (рис. 3). В серой лесной и аллювиально-луговой почвах катены соотношение бактерии/археи также сужалось вниз по профилю от 5.6-7.4 до 3.6-3.8 (рис. 3). В черноземе типичном под лесополосой и пашней различия между горизонтами по  $C_{орг}$  были менее контрастными, поэтому соотношение бактерии/археи мало менялось с глубиной.



**Рис. 3.** Соотношение метаболически активных клеток бактерий и архей в профиле бурой полупустынной почвы (I), серой лесной почвы автономной и транзитной части (1 и 2) и аллювиально-луговой почвы (3) склонового ландшафта (II).

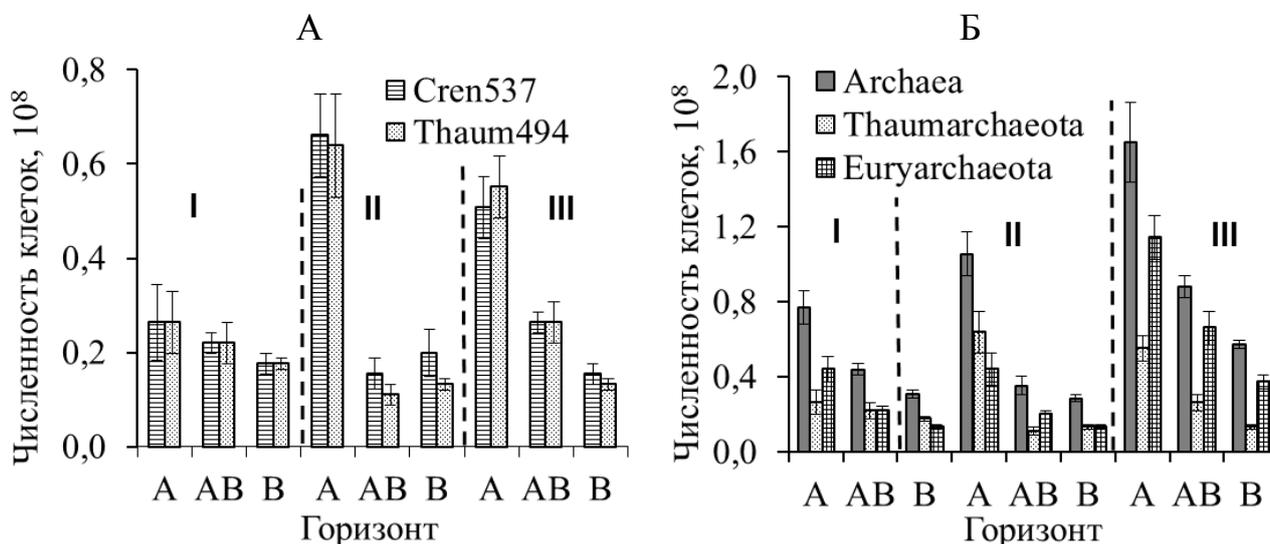
Полученные результаты свидетельствуют о ведущей роли органического вещества в поддержании активного состояния почвенных прокариотов и указывают на возрастание роли архей в процессах оборачиваемости углерода и азота в почве с неблагоприятными экологическими и трофическими условиями.

**Содержание метаболически активных филумов в составе архей.** Использование в исследованиях специфических олигонуклеотидных проб на представителей эвриархеот, таумархеот и кренархеот позволило установить их соотношение в составе метаболически активных архей в почвах разных участков катены. Были обнаружены близкие значения численности таумархеот и кренархеот и уменьшение числа всех групп почвенных архей с глубиной профиля (рис. 4).



**Рис. 4.** Численность метаболически активных клеток архей, гибридизующихся со специфическими олигонуклеотидными пробами. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

Оказалось также, что сумма числа клеток по олигонуклеотидным пробам для трех групп архей больше общей численности архей, полученной пробой Arc915 (рис. 4). Можно заметить, что эта разница почти полностью совпадала с численностью клеток, полученных с помощью пробы Cren537, а сумма филумов эвриархеот и таумархеот равнялась общему количеству архей. С другой стороны, количества кренархеот и таумархеот, полученные двумя специфическими пробами, оказались практически одинаковыми (рис. 5А).

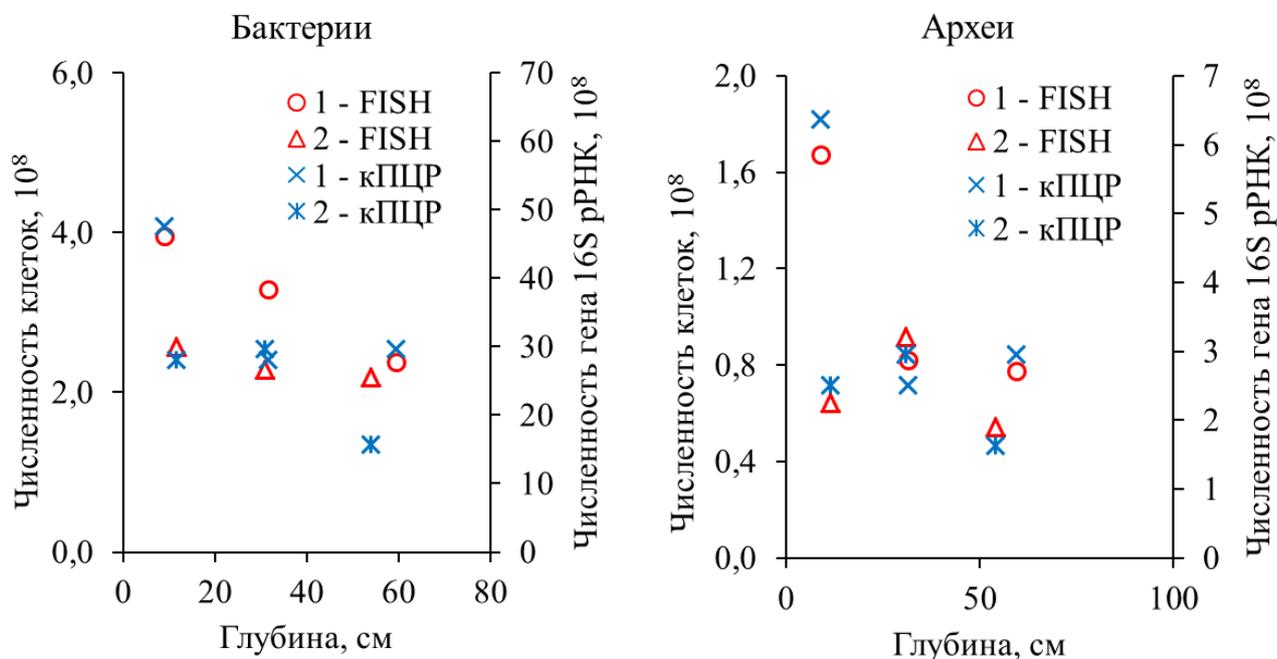


**Рис. 5.** Сравнение численности метаболически активных клеток архей в почвах склонового ландшафта. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

Поскольку таумархеоты из-за их генетической близости относили и по-прежнему часто относят к мезофильной группе кренархеот, используемая проба Cren537, вероятно, детектировала представителей филума таумархеот, тогда как кренархеоты в почвах были метаболически неактивны. Таким образом, в исследуемых почвах среди архей выделяются две метаболически активные филогенетические группы – *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota* (рис. 5Б). За исключением нижнего (аккумулятивного) участка склона, где из-за частого переувлажнения возникали анаэробные условия и потому эвриархеоты были многочисленны и доминировали среди архей, в аэробных почвах автономного и транзитного участков катены численность эвриархеот и таумархеот была близкой.

**Сопоставление численности метаболически активных клеток бактерий и архей с количеством генов 16S рРНК.** Данные по численности клеток архей и бактерий, полученные методом FISH, были сопоставлены с количеством гена 16S рРНК архей и бактерий, детектируемого с помощью количественной ПЦР (кПЦР). Количество гена 16S рРНК почти на порядок превосходило численность активных клеток бактерий, и в несколько раз – клеток архей. В черноземе типичном максимальная численность гена бактерий была обнаружена в верхнем горизонте почвы под лесополосой –  $4.76 \times 10^9$  гена 16S рРНК  $г^{-1}$  почвы (рис. 6). В более глубоких горизонтах количество гена

бактерий снижалось до  $2.81 \times 10^9 - 2.96 \times 10^9$ . В черноземе под пашней, как и в случае с метаболически активными клетками, количество гена бактерий было меньше по сравнению с почвой под лесополосой в 1.7 раза. Численность гена 16S рРНК архей в черноземе типичном была меньше примерно на порядок, снижаясь вниз по профилю от  $6.37 \times 10^8$  до  $2.95 \times 10^8$  гена 16S рРНК  $\text{г}^{-1}$  почвы в почве под лесополосой, и от  $2.50 \times 10^8$  до  $1.63 \times 10^8$  гена 16S рРНК  $\text{г}^{-1}$  почвы в почве под пашней (рис. 6).



**Рис. 6.** Сопоставление данных, полученных методами FISH и количественной ПЦР в черноземе типичном. 1 – Лесополоса, 2 – Пашня.

В серой лесной и аллювиально-луговой почвах катены закономерности, полученные методом FISH, также подтверждались методом кПЦР (рис. 6). Численность гена 16S рРНК бактерий в разных горизонтах серой лесной почвы автономного участка варьировала от  $2.67 \times 10^9$   $\text{г}^{-1}$  почвы до  $7.1 \times 10^8$ , транзитного участка – от  $1.35 \times 10^9$  до  $4.4 \times 10^9$ , а в аллювиально-луговой почве аккумулятивного участка – от  $1.6 \times 10^9$  до  $6.2 \times 10^9$  на  $\text{г}$  почвы. В свою очередь, численность гена архей в почве автономного участка составляла от  $1.92 \times 10^8$  до  $9.88 \times 10^7$ , транзитного – от  $1.76 \times 10^8$  до  $3.19 \times 10^8$ , а аккумулятивного – от  $2.95 \times 10^8$  до  $5.83 \times 10^8$ .

В черноземе типичном количество гена 16S рРНК бактерий превышало численность их метаболически активных клеток в 7.2-12.4 раз, архей – в 3.0-3.8 раз, а в почвах катены (серая лесная и аллювиально-луговая) – в 4.7-12.8 и в 2.5-6.1 раза, соответственно. Количества гена 16S рРНК и метаболически активных клеток архей лучше соответствовали друг другу во всех горизонтах трех рассматриваемых почв ( $r=0.942$ ,  $n=15$ ), чем для бактерий ( $r=0.797$ ,  $n=15$ ). Судя по полученным уравнениям регрессии, в среднем на одну метаболическую клетку бактерий и архей, детектируемых в почве методом FISH, приходится соответственно 7 и 3 генов 16S рРНК этих доменов, выявляемых с помощью кПЦР. Если методом FISH определяется

метаболически активная часть прокариотного комплекса, с помощью кПЦР детектируется общий пул прокариот, как живых, так и неактивных и мертвых.

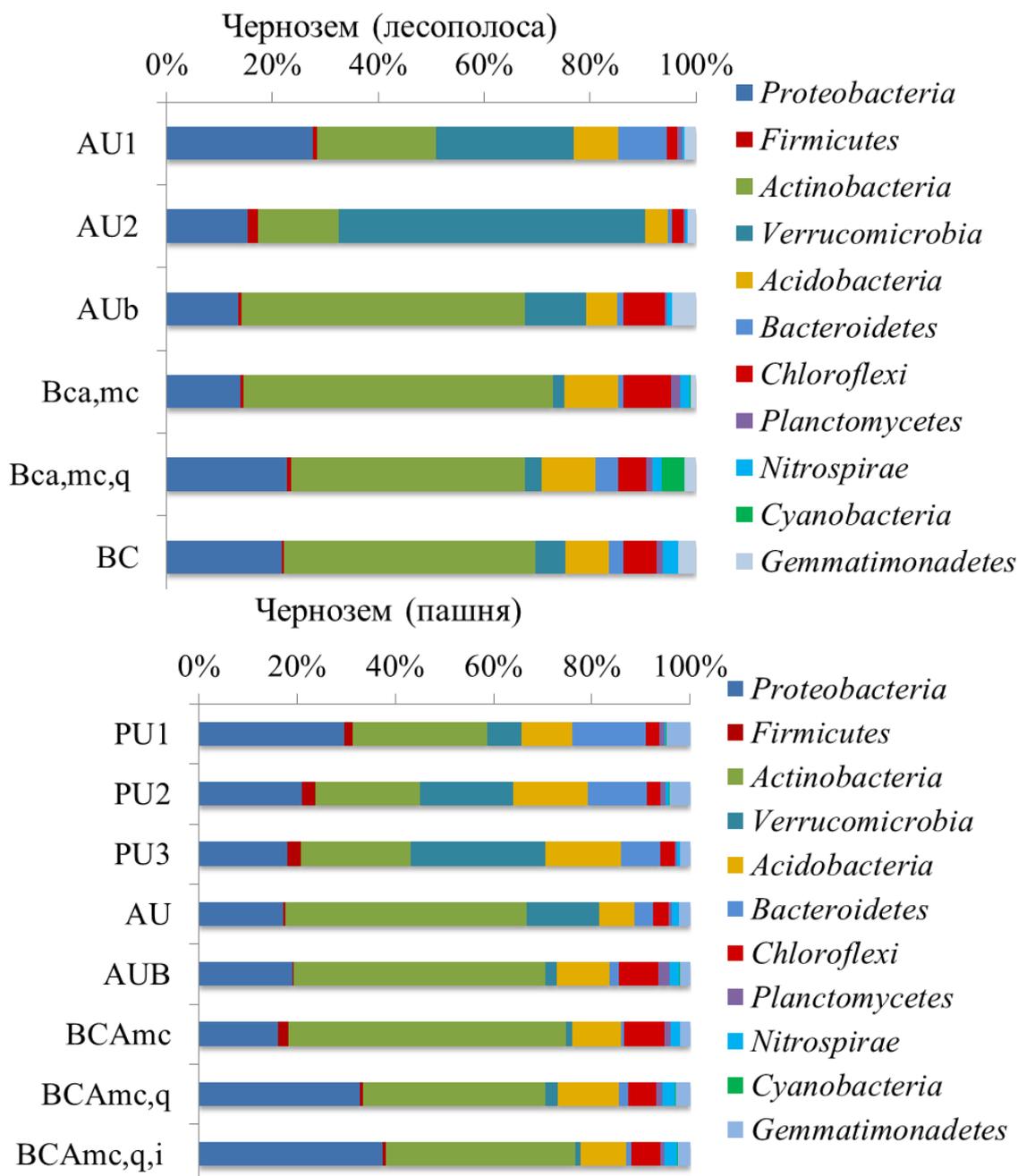
**Размеры метаболически активной биомассы архей и бактерий в почве.** Вопрос о соотношении общей и активной биомассы в почве остается одним из актуальных в почвенно-микробиологических исследованиях. Нами было определено содержание углерода активной биомассы бактерий ( $C_{\text{бакт}}$ ), архей ( $C_{\text{арх}}$ ) и прокариот в целом ( $C_{\text{прок}} = C_{\text{арх}} + C_{\text{бакт}}$ ) в черноземе типичном, серой лесной, аллювиально-луговой и бурой полупустынной почвах по количеству метаболически активных клеток архей и бактерий. Мицелий актинобактерий не детектировался методом FISH при микроскопировании, поэтому его биомасса не учитывалась.

В разных горизонтах почв катены в биомассе метаболически активных бактерий содержалось от 1.19 до 9.94 мкг С г<sup>-1</sup> почвы, в черноземе двух угодий – от 2.37 до 4.27 мкг С г<sup>-1</sup>, а в бурой полупустынной почве целины и пашни – от 0.65 до 2.53 мкг С г<sup>-1</sup>. В свою очередь, содержание углерода биомассы архей варьировало в зависимости от типа почвы, землепользования, глубины профиля от 0.17 до 1.81 мкг г<sup>-1</sup> почвы. Таким образом, на долю активной биомассы прокариот приходится от 1 до 6.8% углерода общей микробной биомассы. В нижних горизонтах почвенного профиля в составе общей микробной биомассы содержится больше углерода активной биомассы прокариот, чем в верхних горизонтах.

### **3.4. ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ**

Оценка микробного биоразнообразия почв является приоритетной темой экологического и биогеографического направлений современной микробиологии. Считается, что до 80-99% почвенных микроорганизмов не может быть идентифицировано и охарактеризовано классическими методами культивирования [Amann et al., 1995]. Использование молекулярно-биологического метода высоко-производительного секвенирования гена 16S рРНК позволяет определить полную таксономическую структуру почвенного микробиома и учесть множество некультивируемых и редких представителей прокариот [Will et al., 2010; Eilers et al., 2011]. Появляется возможность узнать, какими классами, родами и видами представлены бактерии и археи в микробиомах разных почв в условиях природных и сельскохозяйственных экосистем? Как изменяется численность таксономических групп в почвах катены, с глубиной и при агрогенной нагрузке?

**Таксономическая структура чернозема типичного, серой лесной и аллювиально-луговой почв на уровне филумов и классов.** Бактериальное сообщество чернозема исследуемых экосистем состояло преимущественно из представителей 10 филумов: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Наряду с привычным присутствием филумов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, представители недавно открытого филума *Verrucomicrobia* также входили в состав доминирующих таксонов, составляя до 50% в верхнем горизонте чернозема под лесополосой (рис. 7).



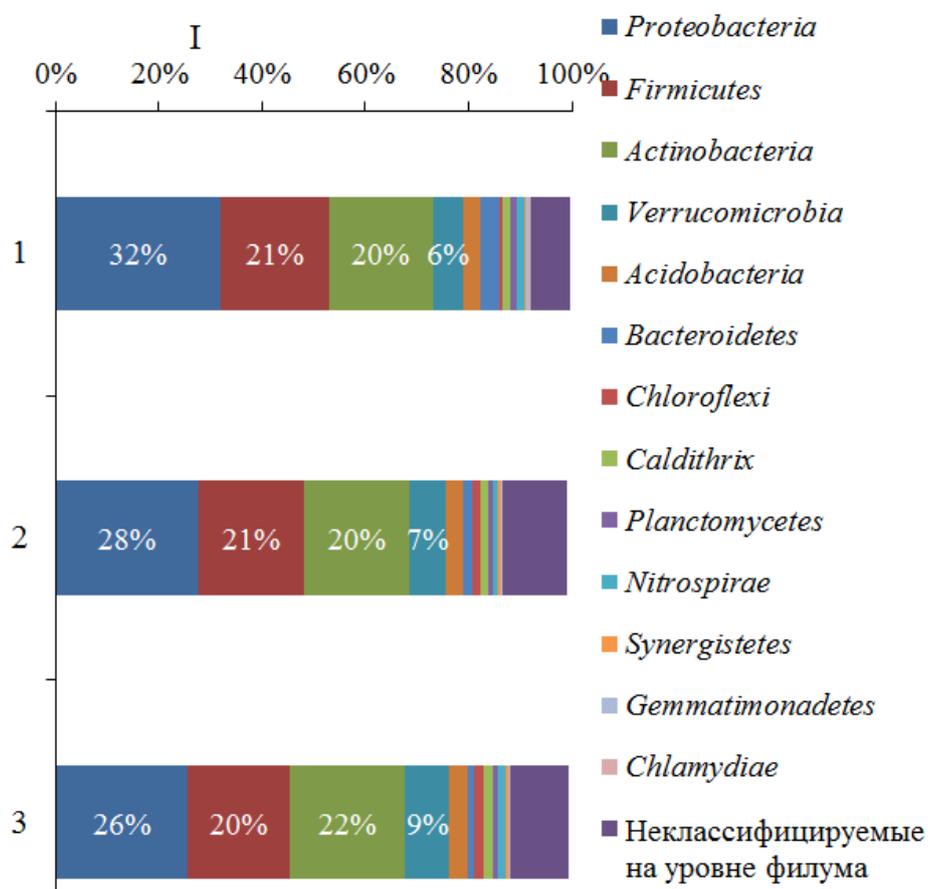
**Рис. 7.** Таксономическая структура бактериального сообщества разных горизонтов чернозема типичного под лесополосой и пашней.

Среди веррукомикробий наиболее представительным оказался вид *Chthoniobacter flavus*. Доля представителей *Verrucomicrobia* сильно уменьшалась с глубиной и была наименьшей – под пашней (рис. 7). Отмеченное выше значительное снижение числа метаболически активных клеток бактерий в пахотном черноземе по сравнению с лесополосой происходило, по-видимому, в основном за счет веррукомикробий.

Высокую представленность в прокариотном сообществе исследуемых почв имели также археи – представители филума *Thaumarchaeota*. Их численность в гумусовом горизонте достигала до 28% от общего количества определяемых прокариот, а в нижележащих минеральных горизонтах существенно снижалась. Таумархеоты играют ведущую роль в биологическом окислении аммония, а их количество в почве коррелирует с содержанием  $C_{орг}$  и

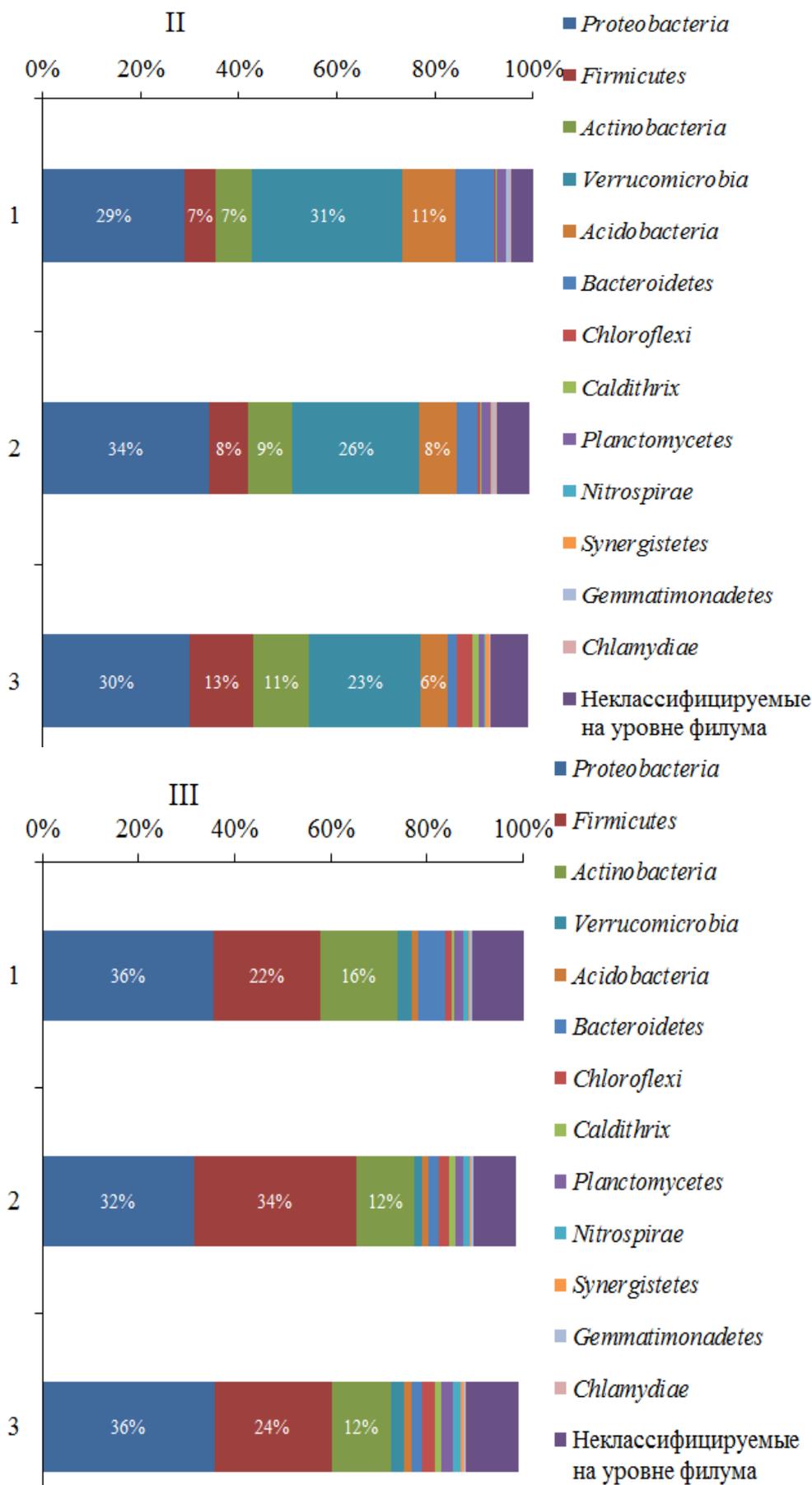
азота [Bates et al., 2011 Pester et al., 2011; Stieglmeier, 2014]. К особенностям таксономической структуры прокариот типичного чернозема можно отнести низкую представленность в составе бактерий филума *Firmicutes* и отсутствие *Euryarchaeota* в составе архей.

В почве автономного участка ландшафта доминировали представители четырех филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia*, на долю которых приходилось с учетом недетектируемых бактерий более 80% почвенного микробиома (рис. 8). В верхнем слое серой лесной почвы автономного участка доля протеобактерий составляла до 32%, уменьшаясь с глубиной. Доля филумов *Firmicutes* и *Actinobacteria* оставалась стабильной на разных глубинах в пределах 20-22%. На долю представителей филума *Verrucomicrobia* приходилось 6-8%. На уровне классов в почве автономного участка склона больше всего детектировалось *Actinobacteria*,  $\alpha$ -*Proteobacteria*, *Clostridia* и *Bacilli*.



**Рис. 8.** Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне филумов серой лесной почвы автономного участка катены (1 – 0-15 см; 2 – 15-40 см; 3 – 40-60 см).

В серой лесной почве транзитного участка ландшафта доминирующее положение в бактериальном комплексе также занимали протеобактерии, но значительной представленностью отличался и филум *Verrucomicrobia* (рис. 9). Менее представленными оказались филумы *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Bacteroidetes*. На уровне классов в почве этого участка катены обнаружено доминирование *Spartobacteria*, которые относятся к филуму *Verrucomicrobia*, и частично  $\alpha$ -*Proteobacteria*.



**Рис. 9.** Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне филумов серой лесной почвы (1 – 0-15 см; 2 – 15-40 см; 3 – 40-60 см) транзитной части (II) и аллювиально-луговой почвы (1– 0-22 см; 2 – 22-40 см; 3 – 40-60 см) аккумулятивной части катены (III).

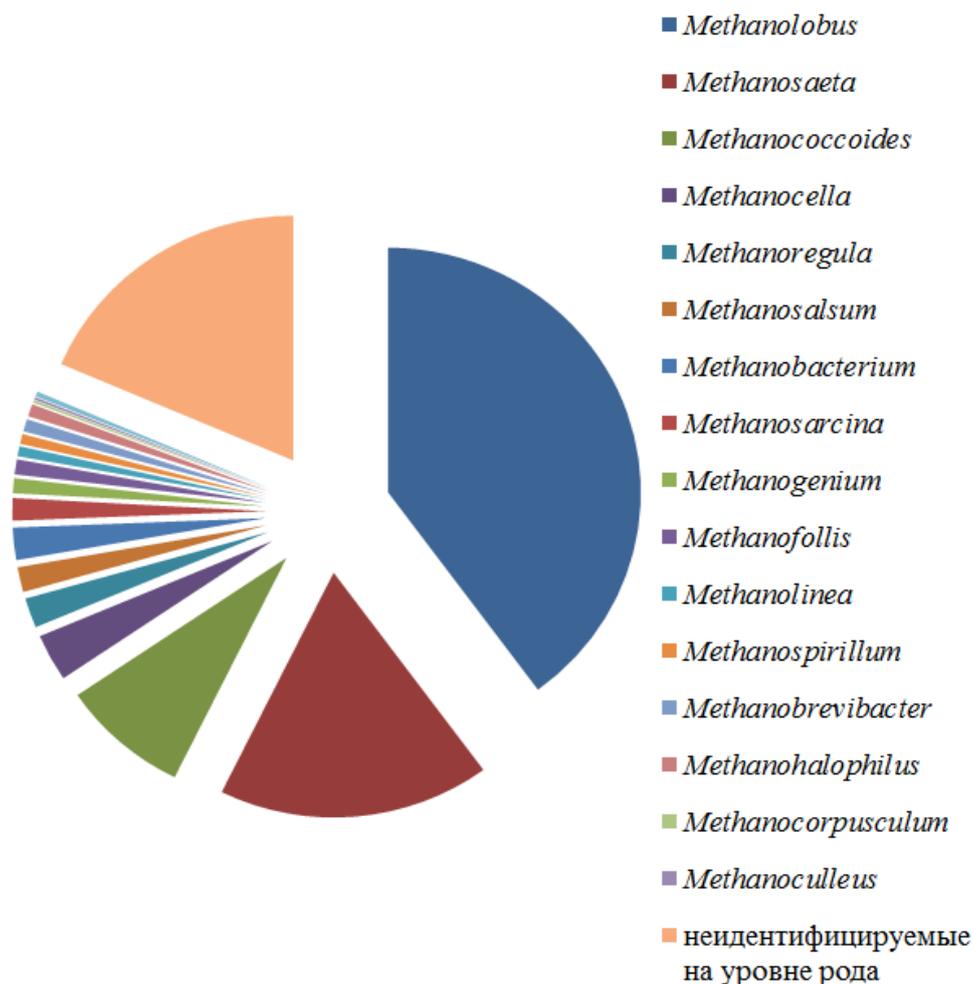
В аллювиально-луговой почве под лугово-болотной растительностью аккумулятивного участка выявлено полное доминирование филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, доля которых составила более 70% от всего бактериального сообщества (рис. 9). В отличие от серой лесной почвы в аллювиально-луговой почве среди основных таксонов не оказалось филума *Verrucomicrobia*. Наиболее представленными классами в почве аккумулятивного участка катены были *Bacilli*, *Clostridia* и *Actinobacteria*.

**Таксономическое разнообразие микроорганизмов на уровне родов.** В серой лесной почве автономного участка ландшафта под залежью самым распространенным оказался род *Chthoniobacter* – представитель филума *Verrucomicrobia*, класса *Spartobacteria*. Среди наиболее представленных родов были также представители филума *Firmicutes* – *Cohnella*, *Bacillus*, *Clostridium* и представитель филума *Actinobacteria* род *Conexibacter*. На долю 5 самых представленных родов приходилось 16.8% от общего количества последовательностей. В почве транзитного участка под лесом, по сравнению с автономным участком, существенно поменялась таксономическая структура сообщества: тотальное доминирование имел род *Chthoniobacter*, а среди доминант были роды *Geobacter* и *Bradyrhizobium*, метанотрофы рода *Methylosinus*. Характерным было отсутствие среди доминирующих родов *Actinobacteria* и *Firmicutes*. В почве аккумулятивного участка под лугово-болотной растительностью доминировали представители филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*: роды *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Saccharopolyspora* и *Gallionella*. Принципиальным отличием аллювиально-луговой почвы от серой лесной почвы других участков катены оказалось отсутствие рода *Chthoniobacter* среди доминант микробного сообщества.

**Видовая структура микробных доминантов.** Наиболее представленным видом в микробиоме серой лесной почвы автономного и транзитного участков оказался *Chthoniobacter flavus*. Характерной особенностью распространения данного вида было значительное снижение его численности с глубиной. Среди доминант в микробном сообществе серой лесной почвы автономного и транзитного участков катены выделялись также *Cohnella soli*, *Pelotomaculum isophthalicum*, *Edaphobacter modestus*, *Caldithrix palaeochoryensis*, *Uliginosibacterium gangwonense*, *Hyphomicrobium vulgare*. Сильно отличающимся микробным сообществом характеризовалась аллювиально-луговая почва аккумулятивного участка катены, для которой характерно периодическое переувлажнение. В аллювиально-луговой почве присутствовали перечисленные выше виды, но доминирующими были – *Bacillus longiquaesitum* и *Bacillus nealsonii*. Помимо высокого разнообразия архей-метаногенов, микробное сообщество аллювиально-луговой почвы было представлено широким спектром бактерий, участвующих в циклах железа (*Gallionella ferruginea*, *Rhodoferrax ferrireducens*, *Rhodoferrax sp.*, *Carboxydocella ferrireducens*, *Gallionella capsiferriformans* и др.) и серы (*Desulfomonile iedjei*, *Sulfurospirillum sp.*, *Desulfonatronum thiosulfatophilum*, *Thermodesulfovibrio thiophilus*, *Thermodesulfovibrio aggregans*, *Ammonifex thiophilus* и др.).

**Метаногенно-метанотрофное сообщество серой лесной и аллювиально-луговой почв катены.** Полевые исследования потоков газов *in situ* показали, что для серой лесной почвы автономной и транзитной части склонового ландшафта характерным было поглощение атмосферного метана [Семенов и др., 2010]. Аллювиально-луговая почва аккумулятивной части ландшафта проявляла свойства как стока, так и источника метана. Наибольшая метанотрофная активность была свойственна поверхностному слою почвы. Высокая скорость поглощения метана в почве транзитной части ландшафта под лесом развивалась на фоне значительного его выделения с глубины ниже 0-20 см. В отличие от других участков ландшафта, в аккумулятивной его части эмиссия метана преобладала уже глубже 10 см, а глубже 20 см она была максимальной.

Количества нуклеотидных последовательностей метанотрофов в почвах хорошо согласовывались со значениями поглощения метана почвой. Среди метанотрофов в микробном сообществе серой лесной почвы автономной и транзитной части катены детектировались два вида - *Methylosinus pucelana* и *Methylosinus acidophilus* класса  $\alpha$ -*Proteobacteria*. В аккумулятивном участке катены состав метанотрофов был более разнообразным: помимо отмеченных двух видов, которые доминировали в метанотрофном комплексе серой лесной почвы, были также идентифицированы отдельные последовательности видов *Methylomicrobium agile*, *Methylomonas scandinavica* и *Methylocystis sp.*



**Рис. 10.** Таксономическое разнообразие метаногенов на уровне рода в аллювиально-луговой почве аккумулятивной части ландшафта.

Как было показано выше, численность метаболически активных клеток эвриархеот в почве аккумулятивного участка была в несколько раз выше по сравнению с почвой автономного и транзитного участков (рис. 5). Оценка таксономического состава *Euryarchaeota* показала присутствие пяти порядков (*Methanosarcinales*, *Halobacteriales*, *Methanobacteriales*, *Methanocellales* и *Methanomicrobiales*), которые, за исключением *Halobacteriales*, являются истинными метаногенами. При этом на долю одного порядка *Methanosarcinales* приходилось почти 75% эвриархеот.

В аллювиально-луговой почве было детектировано 16 родов метаногенов. Наиболее представленными оказались три рода – *Methanlobus*, *Methanosaeta* и *Methanococcoides*, которые, вероятно, и ответственны за продукцию метана почвой (рис. 10). На уровне видов подавляющее большинство последовательностей принадлежат представителям *Methanlobus taylori*, *Methanococcoides methylutens* (*Methanothrix methylens*), *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta pelagica* (рис. 11). На примере аллювиально-луговой почвы хорошо видно, что метан, продуцируемый почвенными метаногенами, может инициировать активность метанотрофных бактерий.

*Methanlobus taylori*  
*Methanococcoides methylutens*  
*Methanosaeta concilii*  
*Methanosaeta pelagica*  
*Methanosaeta thermophila*  
*Methanofollis ethanolicus*  
*Methanobacterium oryzae*  
*Methanobrevibacter gottschalkii*  
*Methanobrevibacter acididurans*  
*Methanobrevibacter acididurans*  
*Methanohalophilus mahii*  
*Methanosarcina siciliae*  
*Methanocorpusculum parvum*  
*Methanocella conradii*  
*Methanobacterium kanagiense*  
*Methanocella paludicola*  
*Methanoregula sp.*  
*Methanosalsum sp.*  
*Methanogenium sp.*  
*Methanolinea sp.*  
*Methanospirillum sp.*  
*Methanoculleus sp.*

**Рис. 11.** Видовой состав метаногенного сообщества аллювиально-луговой почвы катены.

Таким образом, при изучении таксономического состава почвенного микробного сообщества с использованием глубокого секвенирования тотальной почвенной ДНК оказалось, что доминирующими таксонами в составе микробиомов часто выступают виды и таксоны, которые плохо детектировались или вовсе не детектировались методами классической микробиологии. Так, недавно открытый филум *Verrucomicrobia* оказался одним из самых представительных в верхних горизонтах серой лесной почвы и чернозема типичного. Малоизвестный почвенным микробиологам вид *Chtoniobacter flavus* полностью доминировал в микробном сообществе серой лесной почвы транзитного участка под лесной растительностью, на долю которого приходилось более 20% от всех нуклеотидных последовательностей бактерий.

Комбинация молекулярно-биологических методов секвенирования гена 16S рРНК и

флюоресценции *in situ* гибридизации позволяет не только определить количественные и качественные характеристики прокариотного сообщества почв, но и выявить функциональную составляющую микробиома – специфику состава метаногенного и метанотрофного сообществ почв катены в местах превалирования эмиссии и поглощения метана.

## ВЫВОДЫ

1. Количественное выделение почвенной дцДНК является объективным, информативным, воспроизводимым и удобным способом измерения общей микробной биомассы в разных почвах.

2. Количество метаболически активных клеток бактерий в верхнем слое гумусового горизонта отчетливо уменьшается в следующем ряду почв: аллювиально-луговая > серая лесная > чернозем типичный > бурая полупустынная. Число активных клеток архей было в 3.5-7.5 раза меньше, чем бактерий, а последовательность уменьшения в ряду почв была иной: чернозем типичный (лесополоса) = аллювиально-луговая > серая лесная > чернозем типичный (пашня) > бурая полупустынная.

3. Содержание органического углерода в почве было ведущим фактором, контролирующим внутривертикальное распределение метаболически активных клеток архей и бактерий. Уменьшение содержания органического углерода и общего азота сопровождалось сужением соотношения бактерии/археи вниз по профилю почв, свидетельствуя о лучшей приспособленности архей к недостатку углерода и азота.

4. Величины углерода метаболически активной биомассы бактерий и архей колебались в диапазоне 0.65-9.94 мкг г<sup>-1</sup> почвы и 0.17-1.81 мкг г<sup>-1</sup> почвы, соответственно. На долю активной биомассы прокариот приходится от 1 до 6.8% от общей микробной биомассы.

5. Использование специфичных олигонуклеотидных проб выявило, что метаболически активный комплекс сообществ архей представлен филумами *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota*. Нуклеотидные последовательности архей филума *Crenarchaeota* детектируются в почвах, но они, по-видимому, метаболически неактивны.

6. Представители филума *Verrucomicrobia* доминировали в микробиомах серой лесной почве и черноземе естественных экосистем, составляя 31 и 55% соответственно. Численность *Verrucomicrobia* была наиболее чувствительна к агрогенной нагрузке. Среди видов в серой лесной почве и черноземе наиболее представленными были *Chtonibacter flavus*, а в аллювиально-луговой почве *Bacillus nealsonii* и *Bacillus longiquaesitum*.

7. Представители метаногенов *Methanlobus taylori*, *Methanococcoides methylutens*, *Methanosaeta concilii* и *Methanosaeta pelagica* составляют более 60% от видового разнообразия метаногенов, а метанотрофное сообщество представлено преимущественно двумя видами - *Methylosinus pucelana* и *Methylosinus acidophilus*.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Семенов М.В., Манучарова Н.А., Степанов А.Л. Распределение метаболически активных представителей прокариот (архей и бактерий) по профилям чернозема и бурой полупустынной почвы // **Почвоведение**. 2016. №2. С. 239-248.
2. Loeppmann S., Semenov M., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Substrate quality affects microbial- and enzyme activities in rooted soil // **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. 2016. Vol. 179. P. 39–47.
3. Семенов М.В., Стольникова Е.В., Ананьева Н.Д., Иващенко К.В. Структура микробного сообщества почвы катены правобережья р. Оки // **Известия РАН. Серия биологическая**. 2013. № 3. С. 299–308.
4. Семенов М.В., Кравченко И.К., Семенов В.М., Кузнецова Т.В., Дулов Л.Е., Удальцов С.Н., Степанов А.Л. Потоки диоксида углерода, метана и закиси азота в почвах катены правобережья р. Ока (Московская область) // **Почвоведение**. 2010. № 5. С. 582-590.
5. Задорожний А.Н., Семенов М.В., Ходжаева А.К., Семенов В.М. Почвенные процессы продукции, потребления и эмиссии парниковых газов // **Агрохимия**. 2010. № 10. С. 75-92.
6. Semenov M., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. DNA-based determination of soil microbial biomass carbon under conditions of restricted applicability of substrate-induced respiration and fumigation-extraction // *Ecology of Soil Microorganisms*. Prague. Czech Republic. 2015. P. 127
7. Семенов М.В., Манучарова Н.А. Использование метода FISH для визуализации и количественного определения метаболически активных клеток микроорганизмов в почве // Всероссийская конференция с международным участием и школа молодых ученых "Современные методы исследований почв и почвенного покрова». М.: Почвенный институт им. В.В. Докучаева, 2015. С. 294-296.
8. Семенов М.В., Манучарова Н.А. Распределение и соотношение метаболически активных архей и бактерий в черноземе и бурой полупустынной почве // Международная конференция «Генетическая интеграция про- и эукариот: фундаментальные исследования и современные агротехнологии». Санкт-Петербург: ВНИИСХМ, 2015. С. 109.
9. Tkhakakhova A., Chernov T., Zhelezova A., Semenov M., Kutovaya O. Land management and seasonal changes impact on chernozems prokaryotic soil microbial community // 13<sup>th</sup> symposium on bacterial genetics and ecology. Milan: Italy, 2015. P. 230.
10. Chernov T., Zhelezova A., Tkhakakhova A., Semenov M., Kutovaya O. Microbiome taxonomic structure and diversity of two interconnected semi-arid soils of Caspian Depression // 13th symposium on bacterial genetics and ecology. Milan: Italy, 2015. P. 231.
11. Semenov M. Archaeal and bacterial metabolically active cells depending on soil depth and land use // 13th symposium on bacterial genetics and ecology. 2015. Milan: Italy, P. 178.

12. Semenov M., Manucharova N., Stepanov A. Visualization and quantification of archaeal and bacterial metabolically active cells in soil using fluorescence in situ hybridization method // EGU General Assembly 2015. Geophysical Research Abstracts. 2015. Vol. 17. EGU2015-7335.
13. Semenov M., Blagodatskaya E., Kogut B., Kuzyakov Y. DNA-based determination of microbial biomass suitable for frozen and alkaline soil samples // EGU General Assembly 2015. Geophysical Research Abstracts. 2015. Vol. 17. EGU2015-579.
14. Semenov M. Total soil DNA quantification as an alternative microbial biomass determination approach // EGU General Assembly 2015. Geophysical Research Abstracts. 2015. Vol. 17. EGU2015-2826.
15. Semenov M., Manucharova N., Kuzyakov Y. Bacteria-to-Archaea ratio depending on soil depth and agrogenic impact // EGU General Assembly 2014. Geophysical Research Abstracts. 2014. Vol. 16. EGU2014-7838-1.
16. Семенов М.В. Структура и соотношение прокариотной и эукариотной микробной биомассы в почвах катены // 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Секция «Микробиология». Пушкино: 2013.
17. Семенов М.В. Исследование микробного сообщества почвы разных позиций склонового ландшафта // Тезисы XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013». Секция «Почвоведение», Москва: МГУ, 2013. С. 37-38.
18. Стольникова Е.В., Семенов М.В., Иващенко К.В. Микробиологические показатели почв катены правобережья реки Ока // Материалы Международной научной конференции XV Докучаевские молодежные чтения «Почва как природная биогемембрана». СПб.: ВВМ, 2012. С. 275-276.
19. Удальцов С.Н., Семенов М.В., Т.В. Кузнецова, Семенов В.М. Вариабельность потоков диоксида углерода и метана в системе почва-атмосфера на примере катены правобережья р. Ока (Московская область) // Биокосные взаимодействия в природных и антропогенных системах. СПб: ВВМ, 2011. С. 504-506.
20. Семенов М.В. Сравнение почв зонального ряда по скорости потоков парниковых газов *in situ* // XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010». Секция «Почвоведение», Москва: МГУ, 2010. С. 102-103.
21. Семенов М.В. Пространственная вариабельность потоков парниковых газов // XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009». Секция «Почвоведение», Москва: МГУ, 2009. С. 128-129.
22. Семенов М.В. Эмиссия закиси азота серой лесной почвой катены // XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008». Секция «Почвоведение», Москва: МГУ, 2008. С. 116-117.