

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА КАРБОНАТНОГО ЧЕРНОЗЕМА

Индоиту Диана, *научный сотрудник, Институт Микробиологии и Биотехнологии ТУМ.*

Bacteria, one of the most abundant groups of microorganisms in soil, play an important role in organic matter decomposition and nutrient cycling. In-depth studies of soil bacterial communities became possible only thanks to modern metagenomic technologies. This study aimed to assess bacterial diversity in carbonate chernozem of Moldova using next-generation sequencing. The structure of soil bacterial communities in the carbonate chernozem was analyzed using metagenomic technologies for the first time. The soil layer up to 40 cm in the following plots of the eight-field crop rotation was studied: without fertilization since 1950, with organic fertilizers, with mineral fertilizers. The analysis results of 16S rRNA gene sequencing showed that bacterial phyla *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* and *Firmicutes* dominated. In total, 15 bacterial phyla, 26 classes, 78 orders, 107 families and 149 bacterial genera were classified.

This research was conducted as a part of the project #20.80009.5107.08 (ANCD Moldova).

Keywords: *soil microbiome, Bacteria, 16S rRNA gene sequencing, chernozem, fertilization.*

ВВЕДЕНИЕ

Почва являются важным и самым биологически разнообразным компонентом экосистем. Поддержание биоразнообразия почвы имеет важное значение как для окружающей среды, так и для сельскохозяйственного производства, и, следовательно, для продовольственной безопасности населения. Микроорганизмы почвы играют важную роль в функционировании и почвообразовании. Наибольшую долю микробного сообщества почвы составляют почвенные бактерии. По некоторым оценкам, в одном грамме почвы может содержаться от одного до десяти миллиардов бактериальных клеток [9, 2, 3, 7]. Почвенные бактерии играют важную роль в разложении органических веществ,

круговороте питательных веществ, некоторые способны расщеплять токсины, подавлять болезнетворные микроорганизмы, извлекать азот прямо из воздуха, способствуют усвоению фосфора. До сих пор недостаточно информации о факторах, определяющих распространение почвенных бактериальных сообществ, огромное количество почвенных бактерии до сих пор малоизучено. Углубленное изучение почвенных бактериальных сообществ стало возможным только благодаря современным метагеномным технологиям.

Цель данных исследований – провести метагеномный анализ структуры бактериальных сообществ карбонатного чернозема Молдовы на вариантах с длительным применением удобрений (как минеральных, так и органических) в полевом севообороте с использованием секвенирования нового поколения (NGS). Данные исследования проводятся впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовалось бактериальное сообщество карбонатного чернозёма (Calcic chernozem в World reference base for soil resources) длительного стационарного полевого опыта станции «Кетросы» (с 1950-1952 г., с. Кетросы, р-н Новые Анены). Мицелярно-карбонатный чернозём, среднесуглинистый характеризовался при закладке опыта содержанием гумуса 2,2-2,5 %, азота – 0,13-0,20 %, карбонатов в пахотном слое – 1,5-2,4 %, в слое 0-20 см – 1,8-2,2%, P₂O₅ по Мачигину – 0,8-1,5 мг/100 г почвы, K₂O – 18-22 мг/100 г почвы, с повышенной микробиологической активностью (аммонификация, нитрификация). Изучались следующие варианты полевого севооборота: 1. контроль – без внесения удобрений (с 1950 г.); 2. длительное внесение органических удобрений (полуперепревший навоз, всего на севооборот 144 т/га); 3. длительное внесение минеральных удобрений (всего на севооборот N₆₇₅P₄₈₀K₄₈₀). Севооборот восьмипольный: кукуруза на зерно – горох – озимая пшеница – озимая пшеница – кукуруза на зерно – горох – озимая пшеница – подсолнечник. Образцы почвы отбирались из слоёв 0-20 и 20-40 см.

Метагеномный анализ проводился с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Выделение ДНК проводилось с использованием реактивов MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil (Германия). Таксономический анализ бактериального сообщества проводили с использованием универсальных праймеров F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) на варибельной области гена 16SpPHK-v4. ПЦР проводилась на приборе T100 Thermal Cycler (BIO-RAD Laboratories, USA). Библиотеки секвенировали с помощью генетического анализатора MiSeq от Illumina в соответствии с инструкцией изготовителя и с использованием набора реактивов MiSeq ReagentKit v3. Полученные в результате секвенирования данные подвергались двухэтапному анализу: отбирались последовательности на основе качества чтения отдельных оснований, объединялись парно-концевых последовательности с участком перекрытия не менее 35 оснований, удалялись последовательности, длина которых менее 180 п.н., затем осуществлялось удаление из библиотек всех праймеров и последовательностей, содержащих протяженные гомополимерные повторы. При анализе бактериальных сообществ использовался de novo ОТЕ-пикинг. Таксономическая идентификация оперативных таксономических единиц (ОТЕ) проводилась с помощью базы данных RDP (SILVA, <https://www.arb-silva.de/>).

Исследования выполнялись в рамках проекта №20.80009.5107 «Эффективное использование почвенных ресурсов и микробного разнообразия за счет применения элементов биологического (органического) земледелия».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в результате секвенирования варибельных участков гена 16SpPHK-v4 прочтения были сгруппированы в среднем на образец в 19224 ОТЕ бактерий, минимальное содержание ОТЕ составило 13570 штук на образец, максимальное содержание – 24200 штук на образец.

При анализе бактериального сообщества на уровне филума наблюдалось доминирование следующих трёх филумов на всех изученных вариантах (с некоторым колебанием): *Actinobacteriota* (в среднем

доля варьировала на вариантах и в слоях почвы от 11,9 до 17,3%), *Proteobacteria* (от 9,3 до 16,2%) и *Firmicutes* (от 5,6 до 8,1%). Эти филумы представляют собой основную структуру бактериального сообщества карбонатного чернозёма (рис.1). В отличие от бактериального сообщества типичного чернозёма Молдовы, структура которого была также изучена с применением секвенирования нового поколения по той же методике, и где основную структуру составляли также и представители филума *Bacteroidota* [5, 10, 11, 12], в карбонатном чернозёме *Bacteroidota* со средней долей в диапазоне от 1,0 до 4,4% уступал перечисленным выше трём филумам. Далее следовали *Acidobacteriota* (от 1,4 до 1,8%), *Planctomycetota* (от 1,0 до 2,2%), *Verrucomicrobiota* (от 0,8 до 1,4%), *Myxococcota* (от 0,6 до 0,8%), *Nitrospirota* (от 0,3 до 0,6%), *Gemmatimonadota* (от 0,2 до 0,4%), *Cyanobacteria* (от 0,02 до 0,15%), *Chloroflexi* (от 0,02 до 0,08%), *Fibrobacterota* (от 0,01 до 0,08%), *Bdellovibrionota* (0,04%) и *Patescibacteria* (0,02%).

Всего было классифицировано 15 бактериальных филумов и один составили неклассифицированные бактерии (*Unclassified Bacteria*), доля которых была в среднем 2,2%. На вариантах с длительным применением органических и минеральных удобрений в слое почвы 0-20 см было выделено по 15 филумов и один неклассифицированный: на варианте с минеральными удобрениями отсутствовали филумы *Patescibacteria* и *Cyanobacteria*, на варианте с навозом отсутствовали *Patescibacteria* и *Bdellovibrionota*. На контроле без применения удобрений в слое 0-20 см были выделены только 12 бактериальных филумов и один неклассифицированный, отсутствовали *Bdellovibrionota*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacterota* и *Patescibacteria*. В слое 20-40 см на контроле было обнаружено на 3 филума больше, чем в слое 0-20 см – появились филумы *Fibrobacterota*, *Cyanobacteria* и *Patescibacteria*, а на варианте с минеральными удобрениями наоборот, обнаружено отсутствие ещё одного филума – *Bdellovibrionota*. На удобренном навозом варианте количество обнаруженных филумов не изменилось в слое 20-40 см по сравнению со слоем почвы 0-20 см.

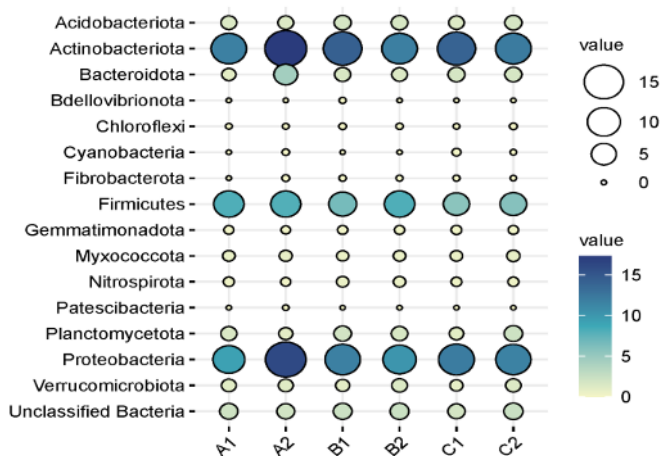


Рисунок 1. Представленность филумов микроорганизмов в составе карбонатного чернозёма: А – контроль без удобрений, В – длительное применение минеральных удобрений, С – длительное применение органических удобрений (навоз); 1 – слой почвы 0-20 см, 2 – слой почвы 20-40 см.

Представители некоторых филумов предпочитали определённые варианты, так филум *Bdellovibrionota* присутствовал только в слое 0-20 см варианта с минеральными удобрениями, а филум *Patescibacteria* – только на контроле в слое 20-40 см. Представители филума *Cyanobacteria* были найдены в слоях 0-20 и 20-40 см только на варианте с навозом, и они совершенно отсутствовали на варианте с минеральными удобрениями. На контроле *Cyanobacteria* была найдена только в слое 20-40 см.

Согласно кривым разнообразия (ранг), видовое богатство на уровне филума было в слое 0-20 см выше на удобренных вариантах, чем на контроле (рис. 2).

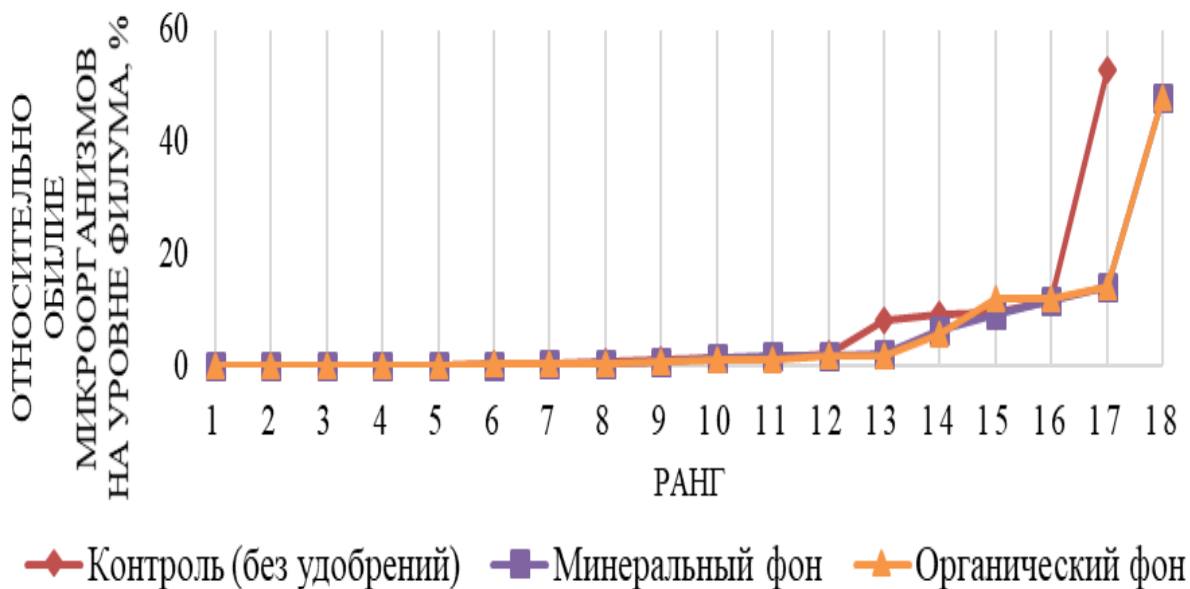


Рисунок 2. Кривые разнообразия (ранжирование) прокариот на уровне филума в слое 0-20 см карбонатного черноземаю

Было классифицировано 26 классов, 78 порядков, 107 семейств и 149 родов бактерий. Наблюдались некоторые колебания относительной численности различных таксонов от уровня филума до уровня рода. В тепловой карте рисунка 3 представлены классифицированные роды бактерий и их относительное обилие. На уровне рода наиболее представленными таксонами оказался на всех вариантах *Bacillus* (2,9-5,5%), относящегося к семейству *Bacillaceae* филума *Firmicutes*. В целом, род *Bacillus* является одним из преобладающих родов почвенных бактерий. Представители данного рода, образующие внутриклеточные споры, выполняют множество экологических функций в почвенной экосистеме. Они участвуют в круговороте питательных веществ, придают растениям стрессоустойчивость и др. Известно, что представители рода *Bacillus* обладают множеством полезных свойств, которые прямо или косвенно помогают растениям за счет получения питательных веществ, общего улучшения роста за счет выработки фитогормонов, защиты от патогенов и других абиотических стрессоров [6]. Наблюдалось доминирование родов *Microtholunatus* и *Blastococcus*. *Microtholunatus* – это род грамположительных, не образующих спор, мезофильных, аэробных и неподвижных бактерий из семейства *Propionibacteriaceae*, филума *Actinobacteriota*. *Blastococcus* относится к семейству *Geodermatophilaceae* и филуму *Actinobacteriota*. Представители данного семейства характеризуются умеренными потребностями в росте, устойчивостью к окислительному стрессу и, как правило, встречаются на камнях, в сухой почве [1, 4].



Рисунок 3. Тепловая карта представленности классифицированных родов бактерий в карбонатном чернозёме: А – контроль, В – минеральный фон, С – органический фон; 1 – 0-20 см, 2 – 20-40 см; синий цвет – низкая представленность, красный цвет – высокая представленность.

ВЫВОДЫ:

1. Впервые с применением метагеномного анализа было оценено бактериальное сообщество карбонатного чернозёма при влиянии такого антропогенного воздействия, как длительное возделывание сельскохозяйственных культур в полевом севообороте и внесение органических и минеральных удобрений. Всего было классифицировано 15 бактериальных филумов, 26 классов, 78 порядков, 107 семейств и 149 родов бактерий. Доля неклассифицированных бактерий присутствует даже на уровне филумов. В слое 0-20 см варианта без применения удобрений было выявлено на 3 филума меньше, чем на удобренных вариантах.
2. Основную структуру бактериального сообщества карбонатного чернозёма составили три филума: *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Филум *Bacteroidota* уступил по доминированию, в отличие от изученной ранее бактериальной структуры типичного чернозёма Молдовы. Филум *Bdellovibrionota* присутствовал только в слое 0-20 см варианта с минеральными удобрениями, *Patescibacteria* – только на контроле в слое 20-40 см, *Cyanobacteria* совершенно отсутствовали на варианте с минеральными удобрениями и была найдена только в слоях почвы варианта с навозом и в слое 20-40 см на контроле.

3. На уровне рода существенно выделялся своей долей представленности род *Bacillus*, относящегося к семейству *Bacillaceae* филума *Firmicutes*, за ним следовали *Microtholunatus*, а также род *Blastococcus*, встречающийся даже на камнях.

Библиография:

1. Eppard, M.; Krumbein, WE.; Koch, C.; Rhiel, E.; Staley, JT. et al. *Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surfaces*. Arch Microbiol, 1996, 166, p. 12–22.
2. Fierer, N.; Leff, J.W.; Adams, B.J.; Nielsen, U.N.; Bates, S.T.; Lauber, C.L.; Owens, S.; Gilbert, J.A.; Wall, D.H.; Caporaso, J.G., 2012. *Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, p. 21390–21395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215210110>
3. Gans, J.; Wolinsky, M.; Dunbar, J. *Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil*. Science, 2006, 309, p. 1387–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1112665>
4. Gtari, M.; Essoussi, I.; Maaoui, R.; Sghaier, H.; Boujmil, R. et al. *Contrasted resistance of stone-dwelling Geodermatophilaceae species to stresses known to give rise to reactive oxygen species*. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 80, p. 566–577.
5. Indoitu, Diana. *The effect of farming system on soil prokaryotic communities in Moldova*. In: proceedings of Intern. Conf. on Microbial Biotechnology, Chisinau, 2022, p. 36.
6. Saxena, A.K.; Kumar, M.; Chakdar, H.; Anuroopa, N.; Bagyaraj, D.J. *Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition*. Journal of Applied Microbiology, 2019, p. 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
7. Schloss, P.D.; Handelsman, J. *Toward a Census of Bacteria in Soil*. PLOS Computational Biology, 2(7): e92, 2006, p. 0786-0793. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092>
8. Trevors, J.T. *One gram of soil: a microbial biochemical gene library*. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 97, p. 99–106. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9397-5>
9. Urich, T; Lanzén, AQiJ.; Huson, DH; Schleper, C, et al. *Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome*. PLOS ONE, 3(6): e2527, 2008, 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002527>
10. Индоиту, Д.Д. *Анализ таксономической структуры микробиома чернозёма типичного*. В: сб. трудов междунар. науч.-практ. конф., Рязань, 2022. - С. 117-120.
11. Фрунзе, Н.И.; Индоиту, Д.Д. *Разнообразие прокариотных сообществ типичного чернозёма*. В: сб. трудов V Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Курск, 2022. – С. 11-12.
12. Фрунзе, Н.И.; Индоиту, Д.Д.; Тону, Н.И. *Прокариоты чернозема типичного Молдовы*. В: сб. трудов междунар. науч.-практ. конф., Рязань, 2022. – С. 154-157.