

УДК 631.4

## ЧИСЛЕННОСТЬ И ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ АЛЛЮВИАЛЬНОЙ БУРОЙ ПОЧВЫ И СОПРЯЖЕННЫХ СУБСТРАТОВ (ВЬЕТНАМ, ЗАПОВЕДНИК ПУ ХОАТ)

© 2022 г. А. В. Князева<sup>a, b, \*</sup>, Л. В. Лысак<sup>a, \*\*</sup>, Н. А. Манучарова<sup>a</sup>,  
Е. В. Лапыгина<sup>a</sup>, А. В. Александрова<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
пр-т Науки, 5, Московская обл., Пушкино, 142290 Россия

\*e-mail: aknyazeva1999@gmail.com

\*\*e-mail: lvlysak@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 31.05.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

Дана количественная и качественная характеристика почвенного прокариотного сообщества аллювиальной бурой почвы, опада и “подвешенной почвы” в корзинках эпифитов. Численность бактерий, измеренная прямым люминесцентным методом, варьировала от 1.1 до 2.6 млрд кл./г почвы и была максимальной в “подвешенной почве”, меньшими значениями характеризовались опад и горизонты А и АВ аллювиальной бурой почвы. В прокариотном сообществе преобладали филумы Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria, значительно меньше были представлены филумы Chloroflexi, Firmicutes и Verrucomicrobia, минимально – Nitrospirae, Planctomycetes и Gemmatimonadetes. Представители домена Archaea обнаружены в горизонте А и в “подвешенной почве”. Их содержание было значительно меньше, чем домена Bacteria, и не превышало 1%. В почве горизонта А археи представлены филумами Thaumarchaeota, Euryarchaeota, в “подвешенной почве” – Thaumarchaeota, Woesearchaeota. На основании рассчитанных экологических показателей ( $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразие, меры сходства по метрикам Брея–Кертиса и weighted UniFrac) выявлено, что микробиом “подвешенной почвы” ближе к таковому горизонта А бурой аллювиальной луговой почвы, а не растительному опад. Метаболически активная часть прокариотного сообщества, представленная филумами Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria, была наибольшей в “подвешенной почве”, меньшей – в опаде и горизонте А бурой аллювиальной почвы, что соотносилось с высокой численностью этих филумов и значительным таксономическим разнообразием бактерий в этом локусе. Функциональные гены (*nifH* и *alkB*) детектированы во всех исследованных субстратах. Численность копий функциональных генов была наибольшей в образце “подвешенной почвы”, что делает этот локус перспективным для выделения штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом.

**Ключевые слова:** численность бактерий, ДНК-метабаркодинг, FISH, численность копий *nifH* и *alkB* генов, Fluvisol

**DOI:** 10.31857/S0032180X22100070

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение биологического разнообразия различных регионов нашей планеты является вопросом первостепенной важности из-за расширения антропогенного воздействия на природные биогеоценозы. Наиболее богатыми с точки зрения видового разнообразия территориями являются тропические леса Северной и Южной Америки, а также Юго-Восточной Азии. Изучение микробных сообществ почв и сопряженных субстратов необходимо для понимания специфики структуры сообществ и участия микроорганизмов в процессах почвообразования в условиях тропическо-

го климата. Разнообразие сообществ культивируемых микроскопических грибов на территории заповедников Вьетнама в течение последних лет детально изучено Александровой с соавт. [1, 9, 10]. Начато исследование разнообразия актиномицетов в почвах и растительном опаде тропических лесов Вьетнама [28]. Изучено разнообразие сообщества прокариот на уровне филумов в некоторых почвах национального парка Кат Тьен [19]. Несмотря на проведенные и проводимые в настоящее время исследования, прокариотные сообщества почв и сопряженных с ними субстратов заповедников Вьетнама продолжают оставаться

“белым пятнам” биогеографии почвенной микробной экологии [27].

Комплексная оценка обилия и разнообразия отдельных таксономических групп прокариот и их метаболической активности широко распространенной и активно используемой на территории Вьетнама аллювиальной бурой почвы при помощи современных молекулярно-биологических методов на территории особо охраняемых природных территориях Вьетнама не проводилась. Такие работы имеют теоретическое (выявление специфики распределения обилия и разнообразия отдельных таксонов микроорганизмов) и практическое значение (поиск культур с важными биотехнологическими свойствами), что и определяет актуальность проводимых исследований.

Цель работы – количественная и качественная таксономическая (филогенетическая) характеристика прокариотного сообщества аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратов (опад, “подвешенная почва”) с использованием современных методов почвенной микробиологии.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на территории особо охраняемых природных территориях Пу Хоат. Объектами исследования служили аллювиальная бурая почва, опад на поверхности почвы, а также “подвешенная почва” в корзинках эпифитов. Материал собрали в рамках работ темы Тропического центра Эколан Э-1.2 “Сохранение, восстановление и устойчивое использование тропических лесных экосистем на основе изучения их структурно-функциональной организации”.

Аллювиальная бурая почва (Dystric Fluvisol (WRB) [35]) имела мощность гумусового горизонта 10–12 см. Далее залегал среднеобогатенный органическим веществом сильноопесчаненный аллювий [18]. Содержание  $C_{орг}$  в гумусовом горизонте 1.7%,  $N_{орг}$  – 0.34%. Реакция среды сильноокислая ( $pH_{KCl}$  4.0–4.6).

Растительный опад представляет собой частично фрагментированный на разных стадиях разложения растительности листовенный материал деревьев *Terminalia* sp. (Терминалия, сем. Комбретовые), *Aglaiа odorata* var. *Gigantea* (Аглая душистая, сем. Мелиевые), мощность над поверхностью почвы составляла 3–5 см.

Характерной особенностью фитоценозов тропических лесов Вьетнама является рост растений-эпифитов на стволах древесной растительности. В настоящей работе рассматривались эпифиты, относящиеся к сем. *Dryopteridaceae* (Щитовниковые). Эпифитные папоротники “корзиночного” типа имеют свойство накапливать значительные (до 40 кг) массы органического и органо-минерального субстрата [3]. Субстрат образуется за счет

мортмассы корней эпифита, а также органических и неорганических поступлений из окружающей среды [16]. Он получил название “подвешенной” или “воздушной” почвы.

Образцы почв и сопряженных субстратов отобрали в апреле–мае 2019 г., хранили в воздушно-сухом состоянии при комнатной температуре (20–22°C). Экспериментальные исследования проводили летом и осенью 2019 г.

Общую численность бактерий и длину актиномицетного мицелия определяли с помощью прямого люминесцентно-микроскопического метода с применением красителя акридина оранжевого [11]. Учет численности прокариотных клеток проводили с использованием люминесцентного микроскопа ZEISS Axioscope 2+. Численность бактерий и длину актиномицетного мицелия рассчитывали по общепринятым формулам [11].

Таксономическую структуру прокариотного сообщества определяли методом высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing: NGS) с использованием платформы Illumina MiSeq методом парно-концевого чтения (2 × 300 пар оснований) генерацией не менее 10000 парных прочтений на образец по последовательностям гена гипервариабельного региона V3–V4 16S рРНК. Подготовку образцов осуществляли по двухстадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР) – амплификация V3–V4 16S рРНК, а затем амплификация ПЦР продукта с целью баркодирования библиотеки. Получаемые ампликоны после очистки на магнитных частицах и измерения концентрации флуориметрическим методом являлись готовыми ДНК-библиотеками.

Данные секвенирования обрабатывали с использованием автоматизированного алгоритма QIIME [22], включающего объединение прямых и обратных прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрации последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных нуклеотидов (качество менее Q20), фильтрации химерных последовательностей. Для разбиения последовательностей на операционные таксономические единицы (ОТЕ) использовали алгоритм с открытым референсным порогом классификации 97%. Выравнивание прочтений на последовательность 16S рРНК и распределение последовательностей по таксономическим единицам проводили с использованием базы данных Silva версии 132 [32].

Оценку разнообразия и сходства бактериальных сообществ исследованных субстратов проводили с помощью индексов  $\alpha$ -разнообразия, рассчитанных при объединении сиквенсов в ОТЕ с уровнем схожести нуклеотидного состава сиквенсов в 97%. Использованы следующие индексы: разнообразия Шеннона ( $H = \sum p_i \ln p_i$ , где  $p_i$  – доля  $i$ -го вида в сообществе) и Chao1, который являет-

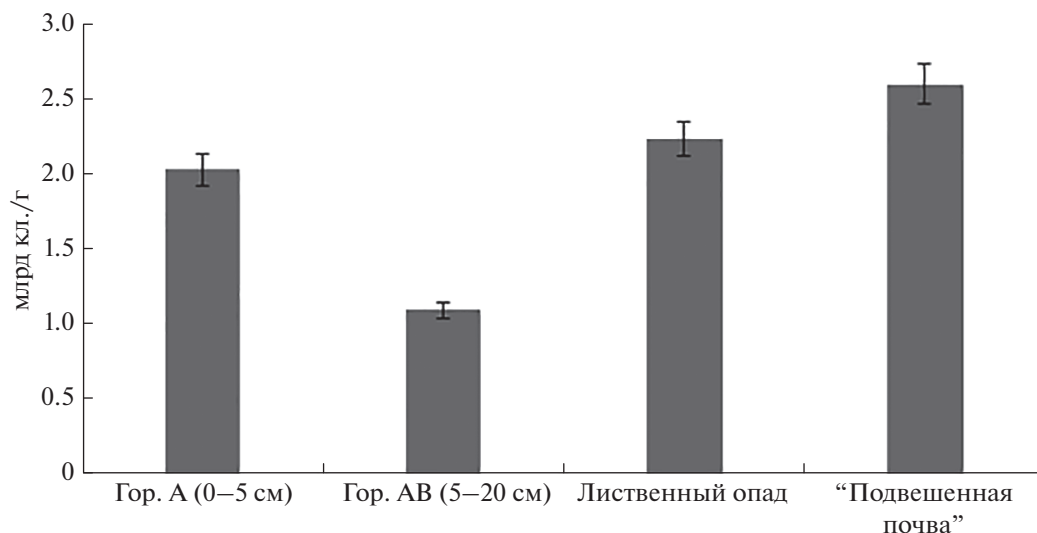


Рис. 1. Общая численность бактерий в разных горизонтах аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратах.

ся показателем видового богатства (общее количество видов в пробе) и чувствительным к редким ОТЕ. Более высокие значения индекса  $Chao1$  указывают на большее разнообразие микробного сообщества [14, 23].

Пул метаболически активных прокариот определяли методом *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH), меченным Су-3 красителем. Применяли зонды, специфичные для доменов *Archaea* и *Bacteria* (филумы  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -*Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*) [12].

Количественную оценку содержания функциональных генов (*nifH* и *alkB*) прокариот осуществляли методом количественной ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили в амплификаторе DTLite4 ДНК-Технология. Реакционную смесь готовили из препарата Super Mix Eva Green (“Bio-Rad”). Для каждого варианта эксперимента (образца) реакцию проводили в трех повторностях. Результаты измерения обрабатывали с использованием пакета программы Real time\_PCR [13, 26].

Для определения наличия гена, отвечающего за способность обеспечения системы азотом (*nifH*), использовали следующие праймеры и условия: Forward 5'-GGTTGTGACCCGAAAGCTGA-3'; Reverse 5'-GCGTACATGGCCATCATCTC-3'. Амплификация: 94°C – 1 мин (94°C 30 с, 50°C 1 мин, 72°C 30 с) (40 циклов), 72°C 10 мин [12].

Для детекции микроорганизмов по направлению бактерий–археи амплификацию фрагмента гена 16S рРНК осуществляли с помощью вырожденных праймеров, комплементарных последовательностям как бактерий, так и архей: PRK341F (CCTACGGGRBGCASCAG) и PRK806R (GGAC-

TACYVGGGTATCTAAT) [13]. Амплификация: 95°C – 3 мин (95°C 10 с, 50°C 10 с, 72°C 20 с) (40 циклов), 90°C 15 с (100 циклов).

Для количественного анализа числа копий функциональный ген *alkB*, отвечающих за разрушение *n*-алканов, применяли следующие праймерные системы и программы амплификации: Forward 5'-TGGCCGGCTACTCCGATGATCG-GAATCTGG-3'; Reverse 5'-CGCGTGGTGATC-CGAGTGCCGCTGAAGGTG-3'. Амплификация: 94°C – 5 мин (94°C 1 мин, 60°C 1 мин, 72°C 1 мин) (30 циклов), 72°C 3 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Определение численности бактерий и длины актиномицетного мицелия.** Общая численность бактерий, определенная с помощью прямого люминесцентного метода, в исследованных образцах почвы и других субстратах варьировала от 1.1 до 2.6 млрд. кл./г почвы. Она была наибольшей в “подвешенной почве” (2.6 млрд кл./г почвы), меньше – в опаде и горизонте А аллювиальной бурой почвы (2.24 и 2.03 млрд кл./г почвы соответственно), наименьшей – в горизонте АВ (рис. 1). Длина актиномицетного мицелия варьировала от 406 до 800 м/г почвы и была наибольшей в листовном опаде (800 м), меньше – в “подвешенной почве” и горизонтах АВ и А, 580, 406 и 178 м/г почвы соответственно (рис. 2).

Следует отметить, что в целом показатели общей численности бактерий в исследованных образцах почвы и сопряженных субстратов были близки к регистрируемым в почвах умеренных широт [5, 17]. Длина актиномицетного мицелия в исследованных субстратах оказалась больше та-

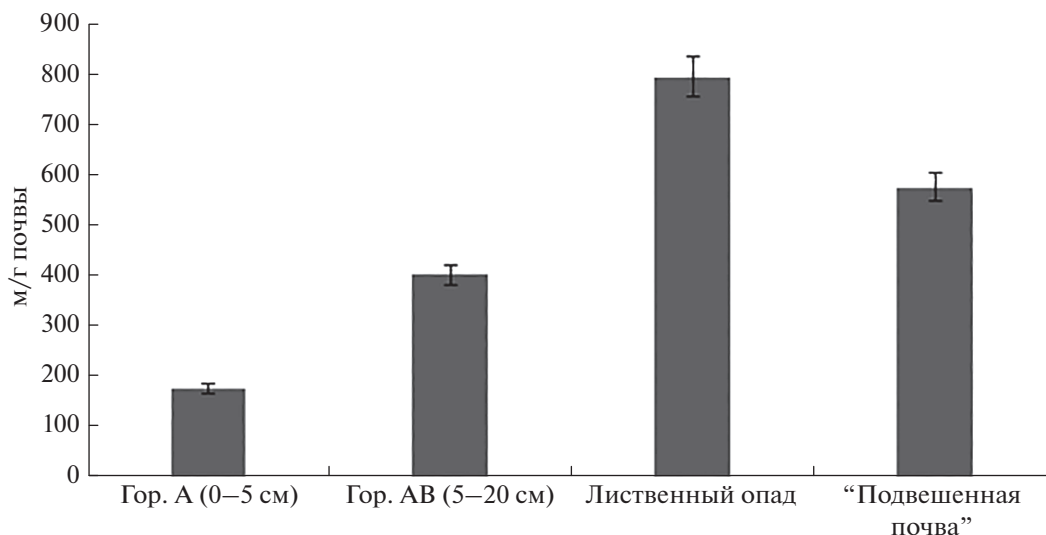


Рис. 2. Длина актиномицетного мицелия в разных горизонтах аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратах.

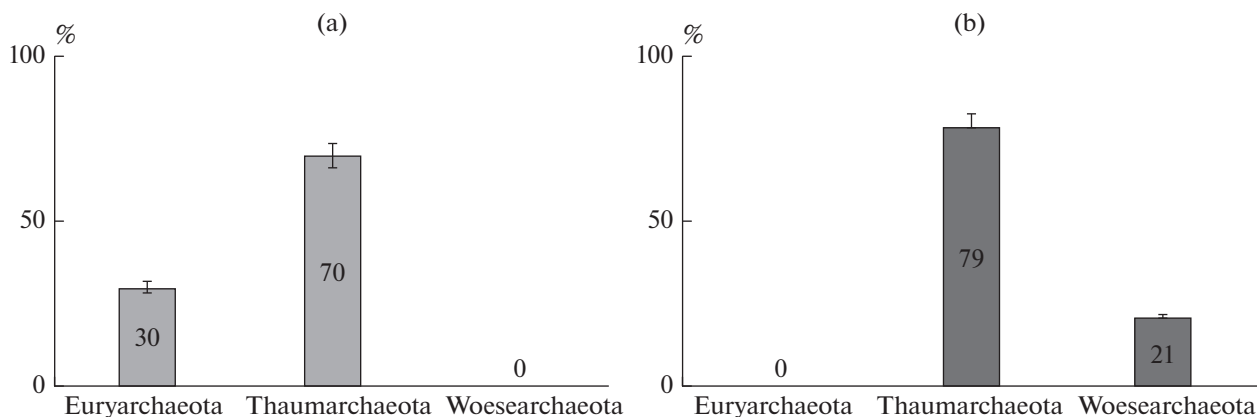


Рис. 3. Соотношение филумов Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Woesearchaeota по данным метабаркодинга в “подвешенной почве” (а) и горизонте А аллювиальной бурой почвы, 0–5 см (b).

ковой для почв умеренных широт и близка для почв аридных территорий [8].

**Таксономическая структура прокариотного сообщества (баркодинг гена 16S рРНК).** Характеристика филогенетического разнообразия бактериального сообщества горизонта А аллювиальной бурой почвы, “подвешенной почвы” из корзинки эпифита сем. Dryopteridaceae (сем. Щитовниковые) и опада получена методом высокопроизводительного секвенирования (баркодинг гена 16S рРНК).

В исследованных образцах почвы и сопряженных субстратов выявлено около 30 филумов прокариот (табл. 1). При этом содержание филумов Proteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Acidobacteria и Actinobacteria превышало 20%. Содержание филумов Verrucomicrobia и Bacteroidetes было значительно меньше (1–10%). Относительно низкое

содержание (<1%) было характерно для бактериальных филумов: Nitrospirae, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Planctomycetes, Chlorobi, Fibrobacteres, Spirochaetae, Armatimonadetes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Chlamydiae и филумов-кандидатов Ignavibacteriae, Parcubacteria, Saccharibacteria, Latescibacteria, Tectobacteria, Aminicenantes, FCPU 426, TM6, PBG-1, GAL15. Представители домена Archaea выявлены в незначительном количестве (не более 1%) и отнесены к филумам Thaumarchaeota, Euryarchaeota и Woesearchaeota (рис. 3).

Обращает на себя внимание факт, что относительное содержание отдельных филумов и их число в почве, опаде и “подвешенной почве” значительно различалось (табл. 1). В почве горизонта А преобладали таксоны филумов Proteobacteria (38%), Chloroflexi (18%), Firmicutes, Acidobacteria и Acti-

**Таблица 1.** Распределение филумов, определенных методом метабаркодинга, в исследованных субстратах

Филумы	Почва (гор. А, 0–5 см)	Растительный опад	“Подвешенная почва”
Bacteria			
Основные филумы (>20%)	Proteobacteria Chloroflexi Firmicutes Acidobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria Acidobacteria Actinobacteria
Прочие филумы (1–10%)	Actinobacteria Verrucomicrobia Nitrospirae	Acidobacteria Actinobacteria Bacteroidetes	Chloroflexi Verrucomicrobia Bacteroidetes Gemmatimonadetes
Минорные филумы (<1%)	Planctomycetes Gemmatimonadetes Chlorobi Bacteroidetes Elusimicrobia Cyanobacteria Chlamydiae Spirochaetae	Gemmatimonadetes Chloroflexi Firmicutes Verrucomicrobia Planctomycetes Armatimonadetes	Nitrospirae Firmicutes Cyanobacteria Elusimicrobia Planctomycetes Chlorobi Fibrobacteres Spirochaetae Armatimonadetes
Филумы-кандидаты (<1%)	Saccharibacteria Tectomicrobia Latescibacteria GAL 15 TM6	Не опр.	Saccharibacteria Ignavibacteriae Latescibacteria Tectomicrobia Aminicenantes Parcubacteria FCPU426 TM6 RBG-1
Archaea			
Филумы	Thaumarchaeota Euryarchaeota	Не опр.	Thaumarchaeota Woesearchaeota
Всего филумов	22	10	27

nobacteria. В опаде доминировал филум Proteobacteria (70%), значительно меньше содержание филумов Acidobacteria (7%) и Actinobacteria (7%), в “подвешенной почве” – филум Proteobacteria (49%), Acidobacteria (19%) и Actinobacteria (11%). Следует отметить, что наиболее широко представлены во всех субстратах филумы Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria, что коррелирует с данными, полученными ранее [15, 19].

Филум Proteobacteria являлся доминирующим во всех исследованных субстратах. Значительное содержание филума Acidobacteria, вероятно, связано с кислой реакцией почвенной среды (рН 4.2–4.9). Высокая доля филума Actinobacteria соотносилась с высоким содержанием мицелия актиномицетов.

Филум Chloroflexi вносил существенный вклад в бактериальное сообщество горизонта А (18%) и “подвешенной почвы” (4%), тогда как филум Bacteroidetes был наиболее представлен в образцах опада и “подвешенной почвы”. Филум Firmicutes доминировал только в образце органоминерального горизонта А почвы (0–5 см). Во всех образцах выявлен недавно описанный и малоизученный филум Gemmatimonadetes, наибольшее содержание которого характерно для “подвешенной почвы”. Представители этого филума выделяли из почв прерий, лугов, а также эвтрофных озерных отложений и альпийских горных почв [25]. Разнообразие сред, в которых были обнаружены представители данного филума, предполагает адаптацию бактерий к условиям

низкой увлажненности [25], которая характерна для сухих периодов года в тропиках.

Представители домена Archaea обнаружены в горизонте А (0.8%) и “подвешенной почве” (0.2%). Интересно, что в растительном опаде этот до детектирован. Обнаруженные в горизонте А археи относились к филумам Thaumarchaeota, Euryarchaeota, в “подвешенной почве” к филумам Thaumarchaeota, Woesearchaeota.

Представители филума Thaumarchaeota окисляют аммиак в анаэробных условиях и являются хемолитотрофами [2, 20]. Обнаруженные в почве археи филума Euryarchaeota относятся к порядку Thermoplasmatales, характеризующегося значительной ацидофильностью, что согласуется с кислотностью почвы (рН 4.2–5.1) [33]. Филум Woesearchaeota входит в созданный в 2013 г. суперфилум DPANN. Представители этого филума ранее обнаружены в отложениях и в поверхностных водах засоленных озер, почвах и некоторых других местообитаниях [31]. На территории Вьетнама и Лаоса данный филум обнаружен в морских донных осадках и гидротермальных источниках [29].

Таксономическое разнообразие доминирующих в бактериальных сообществах исследованных субстратов филумов Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes проанализировано на уровне классов, порядков (табл. 2). Разнообразие, индицируемое ОТЕ, было наибольшим для класса  $\alpha$ -Proteobacteria. Во всех трех проанализированных субстратах доминирующими в филуме Proteobacteria являлись представители порядка

**Таблица 2.** Филогенетическое разнообразие бактериального сообщества в аллювиальной бурой почве, растительном опаде и “подвешенной почве” для основных классов (на уровне операционных таксономических единиц, ОТЕ)

Филум	Класс	Порядок	Почва, ОТЕ	Опад, ОТЕ	“Подвешенная почва”, ОТЕ
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	23	55	48
		Rhodospirillales	14	33	30
		Caulobacterales	5	21	17
		Sphingomonadales	3	28	8
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	13	23	17
		Nitrosomonadales	1	1	5
	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	7	27	23
		Legionellales	2	1	5
		Pseudomonadales	1	5	4
	Deltaproteobacteria	Myxococcales	12	22	18
		Desulfurellales	1	2	5
		Oligoflexales	2	1	4
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	16	5	8
	Clostridia	Clostridiales	35	0	6
		Halanaerobiales	1	0	1
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	5	17	9
	Solibacteres	Solibacterales	21	15	21
Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	6	7	11
		Corynebacteriales	3	3	2
		Micromonosporales	8	6	7
		Streptomycetales	2	4	2
		Streptosporangiales	7	0	3
		Pseudonocardiales	3	0	3
		Micrococcales	2	10	3
		Propionibacteriales	2	3	5
	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	7	7	9
		Gaiellales	4	1	4
Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	6	9	8	
Всего ОТЕ/образец			743	1677	1972

Rhizobiales (20–26%). Основные доминирующие филумы верхнего горизонта почвы и “подвешенной почвы” совпадали: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, однако филум Firmicutes в “подвешенной почве” был представлен в значительно меньших количествах (0.8%), чем в аллювиальной бурой почве (16%), что указывает на значительные отличия бактериальных сообществ исследованных субстратов. Доминирующие таксоны бактерий в опаде включали в себя порядки Rhizobiales, Sphingomonadales и филум Acidobacteria. Высокое содержание бактерий-ацидофилов (Acidobacteria, Solibacteres) соотносится с низкой кислотностью почв (pH 4.2–5.1).

Наиболее часто в исследованных сообществах детектировались представители родов *Bradyrhizobium*, *Variibacter* (филум Proteobacteria), *Acidothermus*, *Mycobacterium* (филум Actinobacteria), *Candidatus solibacter*, *Bryobacter* (филум Acidobacteria), *Bacillus* (филум Firmicutes) (табл. 3).

На основании полученных данных по секвенированию гена 16S рРНК были подсчитаны экологические индексы, характеризующие α- и β-разнообразие прокариотных сообществ на уровне ОТЕ (табл. 4). Наибольшее разнообразие филумов на видовом уровне (97% ОТЕ) относилось к “подвешенной почвы” (1972 ОТЕ), ниже показатели для опада (1677 ОТЕ), наименьшие – к гори-

**Таблица 3.** Доминирующие роды в прокариотных сообществах аллювиальной бурой почвы, растительного опада и “подвешенной почвы”

Основные филумы	Доминирующие роды		
	почва (гор. А, 0–5 см)	опад	“подвешенная почва”
Proteobacteria	<i>Variibacter</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Pedomicrobium</i> <i>Haliangium</i> <i>Burkholderia</i> <i>Acidibacter</i> <i>Sorangium</i>	<i>Sphingomonas</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Rhizobium</i> <i>Novosphongobium</i> <i>Phenylobacterium</i> <i>Variibacter</i>	<i>Variibacter</i> <i>Rhizomicrobium</i> <i>Haliangium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Burkholderia</i>
Actinobacteria	<i>Acidothermus</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Kitasatospora</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Kineosporia</i> <i>Jatrophihabitans</i>	<i>Acidothermus</i> <i>Jatrophihabitans</i> <i>Actinomadura</i>
Acidobacteria	<i>Koribacter candidatus</i> <i>Solibacter</i>	<i>Granulicella</i> <i>Terriglobus</i> <i>Acidobacterium</i> <i>Bryobacter</i>	<i>Candidatus soilbacter</i> <i>Bryobacter</i> <i>Granulicella</i>
Firmicutes	<i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Ruminiclostridium</i> <i>Hydrogenispora</i>	—	—

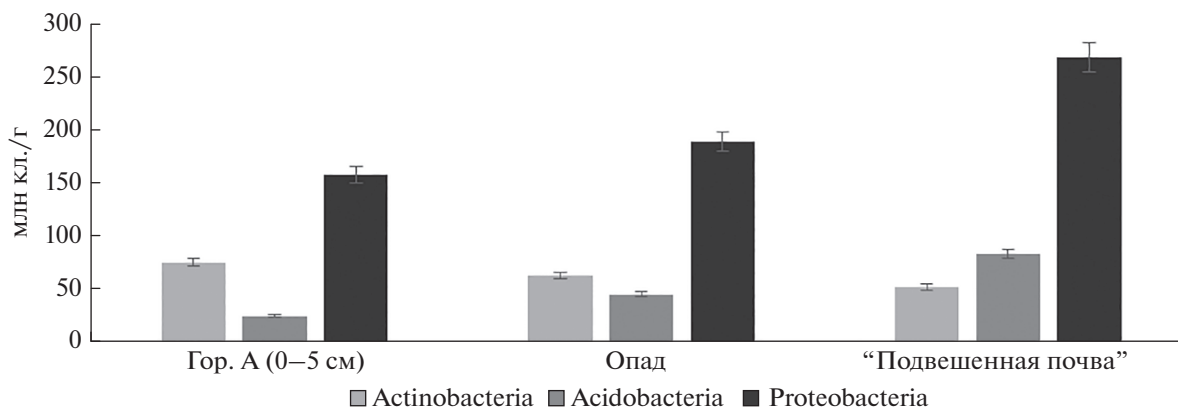
**Таблица 4.** Показатели  $\alpha$ - (индексы Шеннона, Chaol) и  $\beta$ -разнообразия (метрики сходства) прокариотных сообществ аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратов

Показатель	Почва	Опад	“Подвешенная почва”
Количество филумов	22	10	27
Количество определенных ОТЕ (97%)	743	1677	1972
Индекс Шеннона	5.79	5.83	6.76
Индекс Chaol	824	1742.8	2075.7
Сходство с “подвешенной почвой” по метрике Брея–Кертиса	0.41	0.56	0
Сходство с “подвешенной почвой” по метрике weighted UniFrac	0.39	0.53	0

зонту А почвы (743 ОТЕ). Наибольшее  $\alpha$ -разнообразие характерно для “подвешенной почвы”, что подтверждается индексами Шеннона (6.76) и Chaol (2075.7), тогда как эти индексы для горизонта А и опада близки. Сходство сообщества “подвешенной почвы” по метрике Брея–Кертиса было наибольшим с таковым горизонта А аллювиальной бурой почвы и составило 0.41, аналогичные результаты получены с помощью метрики weighted UniFrac (0.39). Обе рассмотренные метрики бинарны и принимают значения в диапазоне от 0 до 1, где 0 отражает полное сходство сообществ, а 1 отсутствие общих таксонов. При общем выявленном сходстве “подвешенной почвы” с аллювиальной бурой почвой, в литературных источниках также показано, что данный субстрат, улавливаемый адаптивными приспособлениями

растений-эпифитов (агеотропными воздушными корнями), близок по изотопному составу азота тканей эпифитов и растений-форофитов, повышенная концентрация зоогенного азота происходит за счет поселения в этом биотопе колоний муравьев [6, 7].

Таким образом, проведенный метагеномный анализ (пиросеквенирование гена 16S рРНК) бактериального сообщества аллювиальной бурой почвы, опада и “подвешенной почвы” выявил доминирование в них филумов Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria. Причем в почве филумы Chloroflexi, Firmicutes и Verrucomicrobia обнаружены в меньшем количестве, а Nitrospirae, Planctomycetes и Gemmatimonadetes — наименьшем. Наибольшие показатели  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия наблюдались в “подвешенной почве” из корзинок



**Рис. 4.** Численность метаболически активных прокариотных организмов наиболее распространенных филумов в исследованных субстратах.

эпифитных папоротников. Прокариотное сообщество “подвешенной почвы” сходно с таковым верхнего (органоминерального горизонта) почвы, менее – с сообществом опада. Данный вывод подтверждается мерами сходства по метрикам Брея–Кертиса (0.41) и weighted UniFrac (0.39).

**Характеристика метаболически активных представителей прокариотного комплекса почвы и сопряженных субстратов.** Проведенный метагеномный анализ (секвенирование гена 16S рРНК) бактериального сообщества аллювиальной бурой почвы, опада и “подвешенной почвы” выявил доминирование в них филумов Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria. Представляло значительный интерес сравнить численность и соотношение метаболически активных представителей этих филумов в изученных субстратах (рис. 4). Обращает на себя внимание факт, что содержание метаболически активных клеток вышеперечисленных таксонов меньше в почве и больше в опаде и “подвешенной почве”. Однако соотношение таксонов в этих субстратах различалось. Доминирующей группой во всех субстратах были протеобактерии, минорной – Actinobacteria и Acidobacteria. При этом наибольшая численность филума Proteobacteria была зарегистрирована в “подвешенной почве”, меньшая – в опаде и верхнем горизонте почвы. Эта закономерность была характерна и для акцидобактерий. Для актинобактерий, напротив, максимальное содержание отмечено в верхнем горизонте почвы и меньшие значения в опаде и “подвешенной почве”. Интересно, что максимальная численность метаболически активных протеобактерий соотносилась с высоким таксономическим разнообразием этого филума в “подвешенной почве”, выявленным с помощью метабаркодинга (табл. 2). Подобные закономерности для ризосферной почвы ранее отмечены другими исследователями [21, 24, 34]. Можно предположить, что “подвешенная почва”

является специфическим субстратом, который несет на себе отпечатки верхнего горизонта почвы, атмосферных выпадений пылеватых частиц, прижизненных выделений биоты и микроорганизмов, попадающих в субстрат с частицами пыли; также значительное влияние на формирование микробного сообщества оказывают корни растений, обильно пронизывающих этот субстрат.

**Детекция функциональных генов (*nifH* и *alkB*) в исследованных образцах.** В дополнение к характеристике филогенетической структуры прокариотного сообщества проведен анализ функциональных генов, отвечающих за активность прокариотного сообщества в процессах азотфиксации (*nifH*) и разложения углеводов (*alkB*). Рассматривали наличие и число копий генов бактерий, способных к осуществлению этих процессов. Гены бактерий азотфиксаторов (*nifH*) способствуют обеспечению почвы азотом, что является одним из ее важных показателей активности. Ген *nifH* обнаружен во всех исследованных субстратах, наибольшая численность выявлена в “подвешенной почве” (0.37 млн копий гена/г почвы), меньшая – в опаде и верхнем горизонте почвы, 0.06 и 0.04 млн копий/г почвы соответственно (рис. 5). Полученные результаты в определенной степени соотносятся с данными метагеномного анализа – в изученных образцах выявлено значительное содержание порядка Rhizobiales и Sphingomonadales, известных как активные азотфиксаторы.

Процесс окисления алканов в почве начинается с гидроксирования алифатических углеводов, что приводит в дальнейшем к образованию альдегида или жирной кислоты [4]. Об активном протекании этого процесса свидетельствует обнаружение гена *alkB* в почве [12]. Бактериальный ген, отвечающий за катаболизм алканов, обнаружен во всех исследуемых образцах. Наибольшая численность этого гена обнаружена в “подвешенной почве” (2.46 млн копий/г почвы), меньшая –



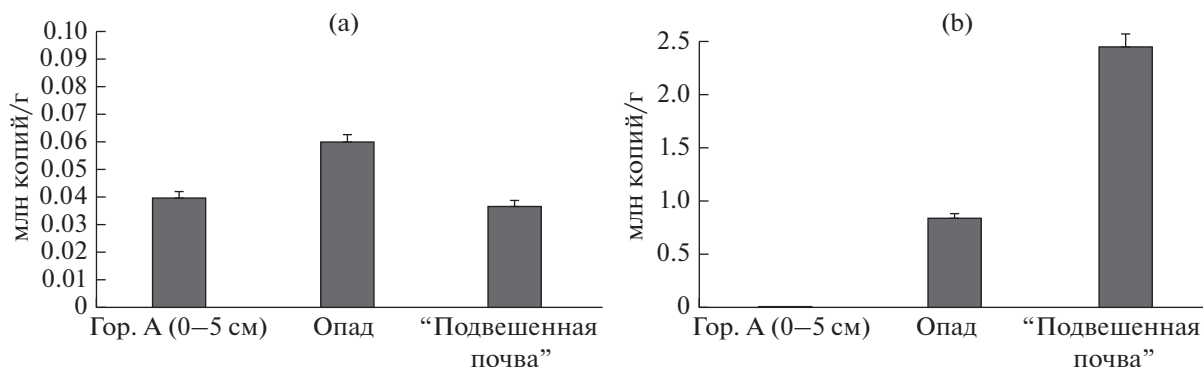


Рис. 5. Количество копий гена *nifH* (а) и *alkB* (б) в аллювиальной бурой почве и сопряженных субстратах.

в опаде (0.84 млн копий/г почвы), наименьшая в верхнем почвенном горизонте. Очевидно, что в “подвешенной почве” можно ожидать значительного присутствия штаммов, способных к деструкции алканов, к которым относятся многие представители родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Burkholderia* (выявлены метабаркодингом).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые дана количественная и качественная характеристика почвенного прокариотного сообщества аллювиальной бурой почвы и сопряженных субстратов (опад и “подвешенная почва”) с использованием прямого люминесцентного метода и современных молекулярно-биологических методов почвенной микробиологии. Численность бактерий (прямой люминесцентный метод) варьировала от 1.1 до 2.6 млрд. кл./г почвы и была наибольшей в “подвешенной почве”, меньшими значениями характеризовались опад и горизонты А и АВ аллювиальной бурой почвы.

В прокариотном сообществе изученных субстратов преобладали бактерии филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*, в меньшинстве – филумы *Chloroflexi*, *Firmicutes* и *Verrucomicrobia*, минорные – филумы *Nitrospirae*, *Planctomycetes* и *Gemmatimonadetes*.

Представители домена *Archaea* обнаружены в горизонте А и “подвешенной почве”, однако их общее содержание было значительно меньше, чем домена *Bacteria*, и не превышало 1%. Детектированные в горизонте А археи относились к филумам *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, в “подвешенной почве” – к филумам *Thaumarchaeota*, *Woesearchaeota*.

На основании рассчитанных экологических показателей ( $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразие, меры сходства по метрикам Брея–Кертиса и *weighted UniFrac* можно сделать вывод, что прокариотное сообщество “подвешенной почвы” ближе к сообществу горизонта А, чем к таковому опада. Метаболически активная часть прокариотного сообщества,

представленная филумами *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*, достигала наибольших значений в “подвешенной почве” и была меньше в опаде и горизонте А почвы, что соотносилось с высокой численностью данных филумов и их значительным таксономическим разнообразием в этом локусе.

Функциональные гены (*nifH* и *alkB*) детектированы во всех исследованных субстратах (горизонт А, опад и “подвешенная почва”). Численность копий функциональных генов была наибольшей в “подвешенной почве”, что делает этот локус перспективным для выделения штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом, способных к фиксации атмосферного азота и разложению алканов.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность администрации и сотрудникам Тропического центра, организовавших комплексную работу по изучению биологического разнообразия и экологии лесов Вьетнама. Особый вклад внесли содиректора Головного отделения Данг Хонг Чием и А.Н. Кузнецов, содиректора Южного отделения Нгуен Ван Тхинь и И.В. Палько. Неоценимую помощь в работе оказали С.П. Кузнецова и Фам Тхи Ха Занг.

Отдельную благодарность хотелось бы высказать администрации и сотрудникам лесных станций особо охраняемых территорий Вьетнама, на которых была предоставлена возможность исследований, за неоценимую помощь и комфортные условия.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Представленное исследование проведено по госзаданию (№ 121040800174-6, № 121032300081-7), а также в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”. Анализ микробиомов проведен при частичной финансовой поддержке Программы

НТР РФ “Анализ микробиомов растений и беспозвоночных животных экстремальных мест обитания с целью разработки штаммов-продуцентов новых метаболитов и ферментов” (договор № 075-15-2021-1396). Проведение ПЦР-реал-тайм при частичной финансовой поддержке гранта РНФ № 21-14-00076.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Александрова А.В., Сидорова И.И., Тиунов А.В.* Микроскопические грибы почв и листового опада национального парка Кат Тиен (Южный Вьетнам) // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. № 1. С. 12–25.
2. *Воробьева Л.И.* Археи. М.: ИКЦ Академкнига, 2007. 234 с.
3. *Второва В.Н., Маркерт Б., Лефлер У.С.* Эпифитные папоротники лесных тропических экосистем как индикаторы состояния окружающей среды (на примере Южного Вьетнама) // Ботанический журн. 2001. Т. 86. № 6. С. 90–101.
4. *Геннадиев А.Н., Пиковский Ю.И., Цибарт А.С., Смирнова М.А., Коротков Л.П.* Углеводороды в почвах: методы определения, состав, поведение (обзор) // Почвоведение. 2015. № 10. С. 1195–1209. <https://doi.org/10.7868/S0032180X15100020>
5. *Головченко А.В., Тихонова Е.Ю., Звягинцев Д.Г.* Численность, биомасса, структура и активность микробных комплексов низинных и верховых торфяников // Почвоведение. 2007. № 5. С. 711–719.
6. *Еськов А.К., Абакумов Е.В., Тиунов А.В., Кузнецова О.А., Дубовиков Д.А., Прилепский Н.Г., Антипина В.А., Кузнецов А.Н.* Агетропные воздушные корни-улавливатели гнездовых эпифитов и их роль в формировании подвешенных почв // Журн. общ. биол. 2017. Т. 78. № 3. С. 54–68.
7. *Еськов А.К., Прилепский Н.Г., Антипина В.А., Абакумов Е.В., Ван Тхинь Н.* Формирование эпифитных сообществ в искусственных лесных посадках Южного Вьетнама // Экология. 2020. № 3. С. 171–180. <https://doi.org/10.31857/S0367059720030075>
8. *Зенова Г.М., Манучарова Н.А., Звягинцев Д.Г.* Экстремофильные и экстремотолерантные актиномицеты в почвах разных типов // Почвоведение. 2011. № 4. С. 457–478.
9. *Калашникова К.А., Александрова А.В.* Почвообитающие микроскопические грибы предгорного тропического леса (лесхоз Лок Бак, Южный Вьетнам) // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. № 2. С. 91–101.
10. *Калашникова К.А., Коновалова О.П., Александрова А.В.* Почвообитающие микроскопические грибы муссонного диптерокарпового леса (заповедник Донг Най, Южный Вьетнам) // Микология и фитопатология. 2016. Т. 50. № 2. С. 97–107.
11. *Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н.* Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС Пресс, 2003. 120 с.
12. *Манучарова Н.А., Ксенофонтова Н.А., Белов А.А., Каменский Н.Н., Арзамасова А.В., Зенова Г.М., Кинжаев Р.Р., Трофимов С.Я., Степанов А.Л.* Прокариотный компонент нефтезагрязненной торфяной олиготрофной почвы при разном уровне минерального питания // Почвоведение. 2021. № 1. С. 80–89. <https://doi.org/10.31857/S0032180X2101010X>
13. *Манучарова Н.А., Ксенофонтова Н.А., Каримов Т.Д., Власова А.П., Зенова Г.М., Степанов А.Л.* Изменение филогенетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения // Микробиология. 2020. Т. 89. № 2. С. 222–234. <https://doi.org/10.31857/S0026365620020093>
14. *Мэгарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с.
15. *Першина Е.В., Чернов Т.И.* Генетическая информация в почве // Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики. СПб.: Информ-Навигатор. 2017. С. 9–18.
16. *Сергеева Т.К., Компанцев А.В., Компанцева Т.В., Второва В.Н.* Разнообразие биоты “подвешенных” почв в тропических лесах Вьетнама (на примере папоротника *Asplenium nidus* L.) // Биологическое разнообразие и современное состояние тропических экосистем Вьетнама. М.-Ханой: Тропцентр, 1998. Кн. 1. С. 261–279
17. *Фомичева О.А., Полянская Л.М., Никонов В.В., Лукина Н.В., Орлова М.А., Звягинцев Д.Г.* Численность и биомасса почвенных микроорганизмов в коренных старовозрастных северо-таежных еловых лесах // Почвоведение. 2006. № 11. С. 1469–1478.
18. *Хохлова О.С., Мякшина Т.Н., Кузнецов А.Н., Губин С.В.* Морфогенетические особенности почв национального парка Кат Тьен, Южный Вьетнам // Почвоведение. 2017. № 2. С. 176–194. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1612008X>
19. *Чернов Т.И., Железова А.Д., Тхакахова А.К. и др.* Микробиомы целинных почв тропических лесов южного Вьетнама // Микробиология. 2019. Т. 88. № 4. С. 479–489.
20. *Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P.* Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota // J. Nature Rev. Microbiol. 2008. V. 6. P. 245–252. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1852>
21. *Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P.C. et al.* Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley // Cell Host Microbe. 2015. V. 3. P. 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
22. *Caporaso J., Kuczynski J., Stombaugh J.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat Methods. 2010. V. 7. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
23. *Chao A.* Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability // Biometrics. 1987. P. 783–791. <https://doi.org/10.2307/2531532>
24. *De Angelis K., Brodie E., De Santis T.* Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots // ISME. 2009. V. 3. P. 168–178. <https://doi.org/10.1128/aem.05005-11>

25. *De Bruyn J., Nixon L., Fawaz M., Johnson M., Radosevich M.* Global Biogeography and Quantitative Season Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 17. P. 6295–6300. <https://doi.org/10.1128/AEM.05005-11>
26. *Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B.* Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. P. 4117–4120. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>
27. *Guerra C.A., Heintz-Buschart A., Sikorski J.* Blind spots in global soil biodiversity and ecosystem function research // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 3870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17688-2>
28. *Hop D.V., Sakiyama Y., Thi C., Binh T., Otoguro M., Hang D.T., Miyadoh S., Luong D.T., Ando K.* Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity // *J. Antibiotics.* 2011. V. 6640. P. 599–606. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.40>
29. *Liu X., Li M., Castelle C.J.* Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woesearchaeotal lineages. *Microbiome.* 2018. V. 6. P. 102. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0488-2>
30. *Manucharova N.A., Kol'tsova E.M., Stepanov A.L., Demkina E.V., Demkin V.A., El'Registan G.I.* comparative analysis of the functional activity and composition of hydrolytic microbial complexes from the lower Volga barrow and modern chestnut soils // *Microbiology.* 2014. V. 5. P. 674–683. <https://doi.org/10.1134/S002626171405018X>
31. *Ortiz-Alvarez R., Casamayor E.O.* High occurrence of Paecearchaeota and Woesearchaeota (Archaea superphylum DPANN) in the surface waters of oligotrophic high-altitude lakes // *Environ. Microbiol. Rep.* 2016. V. 2. P. 210–217. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12370>
32. *Pruesse E., Quast C., Knittel K.* SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 21. P. 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
33. *Reysenbach A.L.* Class IV. Thermoplasmata class. nov. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* V. 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. N.Y.: Springer Verlag, 2001. P. 169. <https://doi.org/10.1601/nm.358>
34. *van Diepeningen A.D., de Vos O.J., Zelenev V.V., Semenov A.M., van Bruggen A.H.* DGGE fragments oscillate with or counter to fluctuations in cultivable bacteria along wheat roots // *Microb. Ecol.* 2005. V. 4. P. 506–517. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0012-7>
35. World Reference Base for Soil Resources 2014, Update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Rome: FAO, 2015.

## Abundance and Taxonomical Diversity of Prokaryotes in Fluvisol and Associated Substrates (Vietnam, Pu Hoat Reserve)

A. V. Kniazeva<sup>1, 2, \*</sup>, L. V. Lysak<sup>1, \*\*</sup>, N. A. Manucharova<sup>1</sup>, E. V. Lapygina<sup>1</sup>, and A. V. Aleksandrova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290 Russia

\*e-mail: aknyazeva1999@gmail.com

\*\*e-mail: lvlysak@mail.ru

The quantitative and qualitative characteristics of the soil prokaryotic community of Dystric Fluvisol, litter, and “suspended soil” are given. The number of bacteria (direct luminescence method) varied from 1.1 to 2.6 billion cells/g of soil and was maximum in the “suspended soil” sample, lower in the litter and horizons A and AB of Dystric Fluvisol. Proteobacteria, Actinobacteria, and Acidobacteria dominated the prokaryotic community (at the phylum level); Chloroflexi, Firmicutes, and Verrucomicrobia were found in smaller amounts; the content of Nitrospirae, Planctomycetes, and Gemmatimonadetes was even lower. Representatives of the Archaea domain were found in horizon A and “suspended soil”, their content was significantly lower than that of the Bacteria domain and did not exceed 1%. In the A horizon, archaea are represented by the phyla Thaumarchaeota and Euryarchaeota; in the “suspended soil”, Thaumarchaeota and Woesearchaeota. Based on the calculated ecological indicators (alpha and beta diversity, measures of similarity by Bray-Curtis metrics and weighted UniFrac), it was shown that the microbiome of the “suspended soil” is closer to the microbiome of horizon A of Dystric Fluvisol than to the litter community. The metabolically active part of the prokaryotic community, represented by the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, and Acidobacteria, reached its maximum values in the “suspended soil” and was lower in the litter and horizon A of Dystric Fluvisol, which correlated with the high abundance of these phyla and the significant taxonomic diversity of bacteria in this locus. Functional genes (*nifH* and *alcB*) were detected in all studied substrates. The number of copies of functional genes was the highest in the “suspended soil” sample, which makes this locus promising for isolating strains with high biotechnological potential.

**Keywords:** bacterial abundance, DNA metabarcoding, FISH, *nifH* and *alcB* gene copies, Fluvisol, Vietnam