

УДК 579.26:631.46

БИОМАССА И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ПОЧВАХ ПРАВОБЕРЕЖЬЯ р. ОКИ

© 2019 г. М. В. Семенов^{1, *}, Н. А. Манучарова², Г. С. Краснов³, Д. А. Никитин^{1, 2}, А. Л. Степанов²¹Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Пыжжевский пер., 7, Москва, 119017 Россия²МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991 Россия

*e-mail: mikhail.v.semenov@gmail.com

Поступила в редакцию 26.10.2018 г.

После доработки 06.11.2018 г.

Принята к публикации 25.12.2018 г.

Приведены данные по содержанию микробной биомассы, численности и таксономической структуре сообществ бактерий и архей в верхних горизонтах серой лесной (Eutric Retisol (Loamic, Cutanic, Humic)) и аллювиально-луговой (Fluvic Gleyic Phaeozem (Loamic, Pachic)) почв автономного, транзитного и аккумулятивного участков склонового ландшафта, представленных залежью, мелколист-венным лесом и лугом соответственно. Микробная биомасса измерялась методами количественного определения ДНК и фумигации-экстракции хлороформом, численность архей и бактерий – методом FISH, а структура микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования ам-пликонов гена 16S рРНК (ДНК-метабаркодинга). Содержание микробной биомассы, а также числен-ность метаболически активных клеток архей и бактерий коррелировали с распределением органиче-ского углерода ($C_{орг}$) и общего азота ($N_{общ}$), увеличиваясь вдоль склона от автономного участка к ак-кумулятивному и уменьшаясь от верхнего горизонта к нижележащим. Аллювиально-луговая почва аккумулятивного участка ландшафта характеризовалась резким уменьшением относительной чис-ленности филума Verrucomicrobia и ростом доли Proteobacteria и Firmicutes по сравнению с серой лес-ной почвой автономного и транзитного участков. Количество операционных таксономических еди-ниц и индексы α -разнообразия значимо коррелировали с C/N , $C_{орг}$, $N_{общ}$ и почти не зависели от pH почвы. Таким образом, расположение в ландшафте определяет не только физико-химические, но и микробиологические свойства почв, формируя пространственную неоднородность численности и структуры микробных сообществ в масштабах мезорельефа.

Ключевые слова: катена, бактерии, археи, метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), ДНК-метабаркодинг

DOI: 10.1134/S0032180X19080124

ВВЕДЕНИЕ

Рельеф оказывает комплексное влияние на свойства почвы и протекающие в ней процессы, поэтому даже небольшие изменения в топографии могут приводить к существенным различиям в экологических условиях на относительно неболь-ших расстояниях [7, 26, 33]. В зависимости от по-ложения в ландшафте складываются особые усло-вия почвообразования, формируются специфиче-ские водный, тепловой и воздушный режимы с отчетливой пространственной вариабельностью физико-химических и биологических свойств почв [12–14]. Почвы склонового ландшафта отли-чаются по содержанию микробной биомассы и ор-ганического углерода [14], потенциальной актив-ности многих гидролитических ферментов, при этом данные различия часто выявляются только в подповерхностных горизонтах [15].

Геоморфологические и флористические осо-бенности местоположений в пределах склоново-го ландшафта отражаются на скорости и направ-ленности многих почвенных процессов, осу-ществляемых микроорганизмами [3, 14, 32]. Вдоль по склону происходит усиление минерали-зации азота и углерода, а также ослабление нит-рификации [24, 39]. Это отражается в увеличении потоков диоксида углерода и закиси азота в на-правлении от автономных участков к аккумуля-тивным [5]. Кроме того, аккумулятивные участки характеризуются частыми периодами переувлаж-нения, что ведет к росту метаногенной активнос-ти в почвах нижних участков склона [5]. Интен-сивность этих процессов зависит от состава, чис-ленности и активности микробного сообщества, присущих почвенно-экологическим условиям разных местоположений в ландшафте [1, 14, 32].

Поэтому вопросы пространственного распределения почвенных микроорганизмов в геохимически сопряженной последовательности почв являются одним из перспективных направлений современной экологии микроорганизмов.

В отличие от бактерий археи продолжают оставаться наименее изученной группой почвенных микроорганизмов, хотя появляется все больше доказательств их широкой представленности в почвах и важной роли в циклах биофильных элементов [11, 38]. Представители филума *Thaumarchaeota* способны проводить окисление аммония, а большинство классов в составе филума *Euryarchaeota* являются метаногенами. Распространение архей в почвах контролируется такими почвенно-экологическими факторами, как влажность, pH [22, 23], содержание углерода и азота [6], вид растительности [34], поэтому можно ожидать существенных сдвигов в численности и активности архей в почвах на разных участках склона.

В выполненной работе проведено определение микробной биомассы, численности и таксономической структуры сообществ бактерий и архей в верхних горизонтах почв с разными физико-химическими свойствами, залегающих в автономной, транзитной и аккумулятивной позициях склонового ландшафта, представленных тремя экосистемами (залежь, лес, луг).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Почвы. Объектом исследований были почвы катены, расположенной на склоне западной экспозиции правой части бассейна р. Любожиха (правый приток р. Ока) в окрестностях г. Пушкино Московской области. В пределах трансекты длиной 960 м были выбраны контрольные точки, соответствующие автономной (участок I), транзитной (участок II) и аккумулятивной (участок III) позициям склонового ландшафта. Координаты контрольных точек отбора: (54°49'05.1" N, 37°35'39.3" E), (54°49'08.2" N, 37°35'01.3" E) и (54°49'08.8" N, 37°34'45.6" E). Расстояние между участками I и II составляло 680, II и III – 280 м. Перепад высот между автономным и транзитным участками составил 20 м, между транзитным и аккумулятивным – 60 м. Автономная и транзитная части ландшафта представлены серой лесной почвой разной степени смывости (Eutric Retisol (Loamic, Cutanic, Humic)), а аккумулятивная – интразональной аллювиально-луговой почвой (Fluvis Gleyic Phaeozem (Loamic, Pachic)). Доминирующая растительность залежной экосистемы автономной позиции – рыхлокустовые и корневищные злаковые травы (20 лет), лесной экосистемы транзитной позиции – вторичный мелкоствольный лес (80 лет), лугово-болотной экосистемы аккумулятивной позиции – лугово-болотная ассоциация.

Отбор почвенных образцов проводили из трех горизонтов: Ah, Ae, Eb (участок I), Ah, Ae, Eb (участок II), Ah1, Ah2, ABhg (участок III). В пределах выделенных генетических горизонтов из трех стенок почвенного разреза отбирали смешанные образцы в трехкратной повторности. Образцы почв, используемые для определения микробной биомассы методами фумигации-экстракции и количественного анализа ДНК, а также секвенирования ампликонов 16S рРНК гена, хранили при –20°C, для количественного подсчета численности метаболически активных клеток методом FISH – при температуре +4°C. Физико-химические свойства почв определяли в воздушно-сухих образцах. Весовую влажность свежих образцов почвы определяли высушиванием при температуре +105°C в течение 24 ч. Содержание органического углерода ($C_{орг}$) и общего азота ($N_{общ}$) в почве определяли на автоматическом HCNS-анализаторе Leco 932 (США). Величины водного pH почвы измеряли потенциометрическим способом при соотношении почва : вода, равном 1 : 2.5.

Экстракция тотальной ДНК из почв. Почвенную ДНК экстрагировали из образцов массой 0.5 г с помощью набора FastDNA SPIN kit for Soil (MP Biomedicals, Germany) согласно протоколу производителя. Гомогенизацию почвенных образцов производили с использованием гомогенизатора FastPrep (MP Biomedicals, Germany). Выделенные экстракты ДНК до анализа хранили при температуре –20°C.

Определение содержания углерода микробной биомассы ($C_{мик}$) осуществляли методом фумигации-экстракции в парах хлороформа с использованием 0.05 М раствора K_2SO_4 [36]. Содержание экстрагированного углерода в вытяжках измеряли с использованием C/N-анализатора Multi N/C analyzer 2100S (Analytik Jena, Германия). Величину углерода микробной биомассы определяли по разнице между экстрагированным углеродом из фумигированной и нефумигированной почвы, используя коэффициент пересчета $k_{EC} = 0.45$.

Углерод микробной биомассы определяли методом количественной экстракции тотальной почвенной двухцепочечной ДНК (дцДНК) [29, 36]. Для количественного анализа использовали флуоресцентный краситель PicoGreen (Molecular Probes, Life Technologies, Германия). Активность флуоресценции определяли с использованием автоматического флуориметра (Wallac 1420, Perkin Elmer, Turku, Финляндия) в диапазоне возбуждения 485 нм и эмиссии 525 нм. Углерод микробной биомассы $C_{мик}$ рассчитывали путем умножения содержания дцДНК на пересчетный коэффициент $F_{днк}$, равный 5.10 [28, 36].

Процедура определения метаболически активных клеток бактерий и архей с использованием метода гибридизации *in situ* (метод FISH) включала

Таблица 1. Основные химические и биологические показатели почв разных позиций склонового ландшафта

Горизонт	Глубина, см	C _{орг} , %	N _{общ} , %	C/N	pH	ДНК-C _{мик} , мкг/г	ФЭ-C _{мик} , мкг/г	$\frac{C_{\text{мик}}}{C_{\text{орг}}}$, %
Автономная позиция склонового ландшафта								
Ah	0–15	1.41	0.14	10.4	6.24	302	307	2.14
AE	15–36	0.85	0.08	10.4	6.67	94	114	1.11
EB	36–54	0.55	0.06	9.0	6.82	63	79	1.15
Транзитная позиция склонового ландшафта								
Ah	0–18	2.23	0.19	12.1	5.19	453	439	2.03
AE	18–38	0.49	0.06	8.8	5.79	40	49	0.80
EB	38–57	0.35	0.04	8.1	5.91	35	40	0.99
Аккумулятивная позиция склонового ландшафта								
Ah1	0–20	4.78	0.40	11.9	7.02	840	816	1.76
Ah2	20–38	1.79	0.17	10.7	6.91	209	203	1.17
ABhg	38–62	1.66	0.16	10.6	6.87	186	193	1.12

в себя десорбцию клеток от почвенных частиц, фиксацию клеток, нанесение фиксированного образца на поверхность предметного стекла, гибридизацию со специфичными пробами и микроскопирование [6, 31]. Фиксацию клеток проводили с помощью формальдегида. Для гибридизации использовали меченные флуоресцентным красителем Су3 рРНК-специфичные олигонуклеотидные пробы EUB338, EUB338-II и EUB338-III для определения клеток бактерий и ARCH915 для клеток архей [9, 18]. Филогенетические группы в составе домена Archaea определяли с помощью специфических проб CREN537 и EURY806 [37], соответствующих филумам *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*. Стекла с готовыми препаратами анализировали с помощью микроскопа ZEISS Аxioskop 2 plus (Германия) со светофильтрами Filter set 15 для Су3-меченных зондов.

ДНК-метабаркодинг. Для проведения анализа проводили амплификацию регионов V3-V4 гена 16S рРНК с использованием универсальных прямого и обратного праймеров 341F и 805R [25]. После получения ампликонов библиотеки очищали и смешивали эквимольно с помощью набора SequelPrep™ Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США). Результирующий пул библиотек проверяли на капиллярном электрофорезе и затем секвенировали на приборе Illumina MiSeq.

Биоинформатический анализ результатов секвенирования. Обработку данных, полученных в результате секвенирования ампликонов генов 16S рРНК, проводили при помощи программной среды R и QIIME [16]. Склеивание прямых и обратных нуклеотидных последовательностей осуществляли методом fastq-join. Операционные таксономические единицы (ОТЕ) идентифицировали с

использованием алгоритма UCLUST на основе 97%-ного порога сходства сиквенсов по библиотеке реферативных сиквенсов базы данных RDP. Синглтоны (ОТЕ, содержащие один сиквенс), митохондрии и хлоропласты удаляли.

Для определения показателей общего разнообразия прокариотных сообществ (α -разнообразие) рассчитывали индексы Шеннона и Chaol. При расчете индексов разнообразия проводили нормализацию данных по образцу с минимальным числом полученных сиквенсов. Различия структуры бактериальных сообществ (β -разнообразие) между разными горизонтами почв анализировали методами unweighted и weighted UniFrac [30] при помощи многомерного неметрического шкалирования (NMDS).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химические свойства и углерод микробной биомассы почв. Содержание органического углерода и общего азота в верхних горизонтах почв последовательно увеличивалось вдоль склона от автономной к аккумулятивной позиции, составляя 1.41–0.14, 2.23–0.19, 4.78–0.40% для участков I, II и III соответственно (табл. 1). В нижележащих горизонтах почв величины C_{орг} и N_{общ} значительно уменьшались, хотя гор. Ah2 и ABhg аллювиально-луговой почвы были достаточно гумусированными. Отношение C/N в разных горизонтах почв колебалось в диапазоне от 8.1 до 12.1. Серая лесная почва автономного и транзитного участков характеризовалась слабокислой реакцией среды, аллювиально-луговая – нейтральной.

Оба метода измерения микробной биомассы с помощью количественного определения дцДНК и фумигации-экстракции хлороформом дали

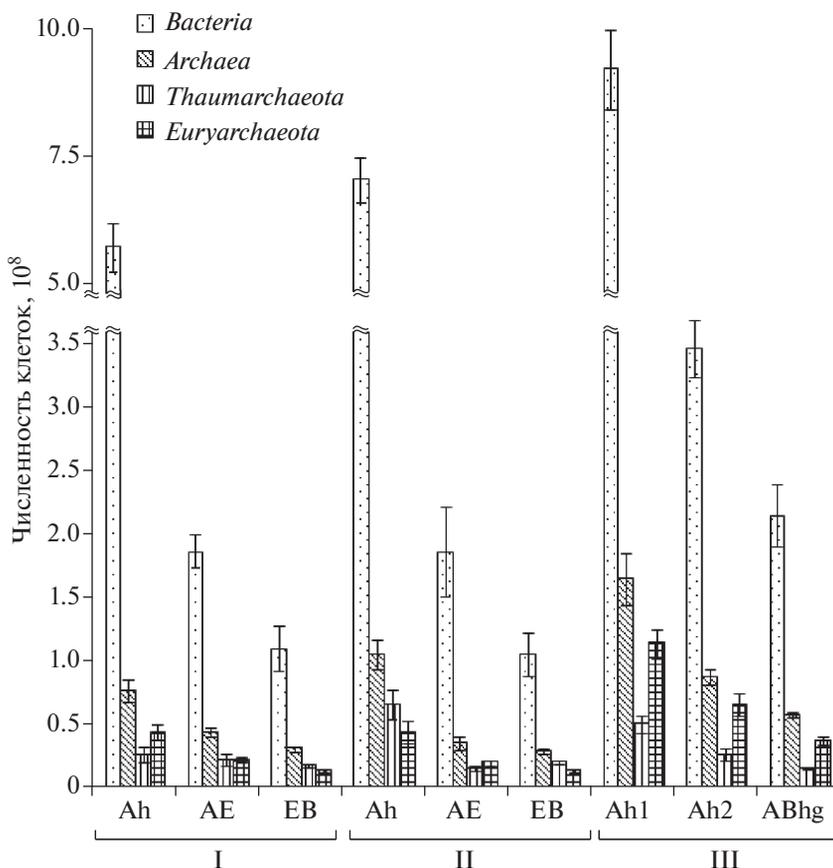


Рис. 1. Численность метаболически активных клеток бактерий и архей, в том числе таумархеот и эвриархеот, гибридизирующихся со специфическими олигонуклеотидными пробами. Здесь и далее: I – серая лесная почва автономной части ландшафта, II – серая лесная почва транзитной части ландшафта, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части ландшафта.

близкие величины $C_{мик}$ в почвах. Распределение микробной биомассы соответствовало содержанию $C_{орг}$ и $N_{общ}$, увеличиваясь вдоль склона от участка I к участку III и уменьшаясь от верхнего горизонта к нижележащим. Максимальное количество микробной биомассы (840 мкг/г) почвы находилось в верхнем гор. Ah1 аллювиально-луговой почвы.

Отношение $C_{мик}/C_{орг}$ является индикатором доступности почвенного углерода для микроорганизмов [10]. Его сужение в почве указывает на прочность стабилизации органического субстрата или на наличие экологических условий и физических барьеров, препятствующих потреблению субстрата микроорганизмами. Увеличение содержания общей микробной биомассы в почвах от автономной позиции ландшафта к транзитной и аккумулятивной в 1.8 и 2.8 раза соответственно, сопровождалось уменьшением ее доли в почвенном органическом веществе. Этот факт согласуется с превалированием аккумуляционных процессов в трансформации органических

материалов в переувлажненных условиях под лугово-болотной растительностью.

Численность метаболически активных клеток бактерий и архей в почвах разных участков катены. Количество метаболически активных клеток бактерий и архей в верхнем горизонте почв последовательно увеличивалось вниз по склону, от 5.7 до $9.2 \times 10^8 \text{ г}^{-1}$ почвы для бактерий, и от 0.8 до $1.7 \times 10^8 \text{ г}^{-1}$ почвы для архей. Численность бактерий резко уменьшалась с глубиной: по сравнению с поверхностным гор. Ah, в двух нижележащих горизонтах количество бактериальных клеток снижалось в 3.0–5.2 раза в почве участка I, в 3.8–6.7 раз – в почве участке II (рис. 1). В аллювиально-луговой почве участка III убывание численности бактерий с глубиной было более плавным (в 1.9–2.9 раз), что объясняется высоким содержанием углерода и азота в нижележащих горизонтах. Численность метаболически активных клеток архей уменьшалась в нижележащих горизонтах в 1.5–3 раза.

Полученные данные по численности архей и бактерий в серой лесной и аллювиально-луговой

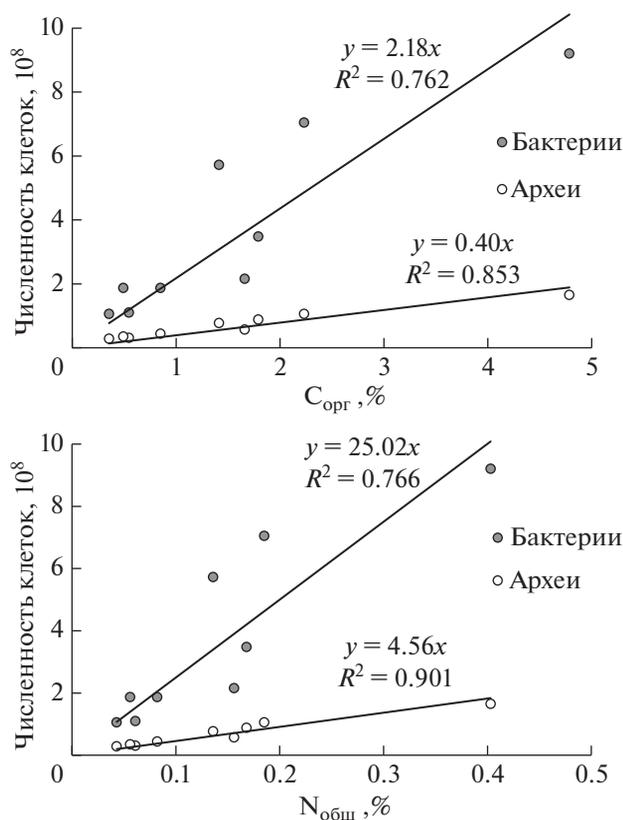


Рис. 2. Зависимость численности метаболически активных клеток бактерий и архей от содержания органического углерода и общего азота в почве.

почвах катены оказались сопоставимы с результатами метаболически активных клеток, ранее полученными для черноземов и бурых полупустынных почв [6]. Как и в предыдущем исследовании, численность метаболически активных клеток исчислялась $n \times 10^8$ для бактерий и $n \times 10^7$ для архей. Тем не менее, в отличие от серых лесных и бурых полупустынных почв черноземы характеризовались значительно меньшим количеством активных клеток на единицу углерода. Данный эффект может быть обусловлен недостаточным снабжением микроорганизмов органическим углеродом в черноземе из-за большей защищенности органического вещества [4], а также недоучетом клеток из-за сложности их отделения от глинистой фракции черноземов [6]. Полученные нами значения метаболически активных клеток имели одинаковый порядок с обилием рибосомальных генов бактерий и архей в серой лесной почве — 9.6×10^8 и 9×10^7 копий генов г^{-1} почвы соответственно [2].

Проведено определение двух ведущих филумов в составе архей: *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*. Численность таумархеот в верхних горизонтах почв колебалась от 0.26×10^8 до 0.64×10^8 кл./г

почвы с максимумом для лесной экосистемы транзитного участка склона. Количество метаболически активных клеток эвриархеот автономного и транзитного участков склона было одинаковым (0.44×10^8 кл./г почвы), но увеличивалось в 2.6 раза в переувлажненном участке III.

Соотношение бактерии/археи существенно сужалось с глубиной, а также в направлении от автономного участка к аккумулятивному. Величины данного соотношения в верхних горизонтах составили 7.4, 6.7 и 5.6 для участков I, II и III соответственно. Это означает, что вклад архей в общую метаболически активную биомассу прокариот в гор. Ah составил 12–15%. В подповерхностных горизонтах доля архей возрастала, достигая 16–21%.

Различные исследования показывают как снижение доли архей с глубиной [9], так и увеличение [19, 23]. Упомянутые данные основаны на ДНК-методах, которые не дают представления о количественном распределении активных архей и бактерий. Еще одной трудностью при оценке вклада архей в микробное сообщество является проблема соотношения количества копий рибосомальных генов в разных группах микроорганизмов. Количество копий рибосомальных генов составляет от 1 до 15 для бактерий и от 1 до 4 для архей [27]. Это означает, что при оценке соотношений бактерии/археи вклад архей в микробное сообщество будет недоучитываться всеми методами, основанными на количественной оценке генов 16S рРНК. Подсчет численности метаболически активных клеток РНК-методом FISH показал, что в почвах увеличивается доля именно активно функционирующих архей [6]. Таким образом, роль архей в биогеохимических процессах почвенного профиля, по-видимому, увеличивается с глубиной.

Между численностью метаболически активных клеток обоих доменов и содержанием $C_{\text{орг}}$ и $N_{\text{общ}}$ была выявлена тесная линейная зависимость (рис. 2). Таким образом, повышение обеспеченности почвы органическим углеродом и общим азотом приводило к закономерному постепенному росту количества метаболически активных клеток, как архей, так и бактерий. При этом отклик численности бактерий на увеличение содержания $C_{\text{орг}}$ и $N_{\text{общ}}$ был в 5 раз выше, чем архей. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что бактерии гораздо более чувствительны к обеспеченности субстратом и хуже приспособлены к условиям энергетического стресса по сравнению с археями [40].

Таксономическая структура микробных сообществ почв катены. Бактериальное сообщество почв катены состояло преимущественно из представителей 7 филумов: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, на долю которых приходи-

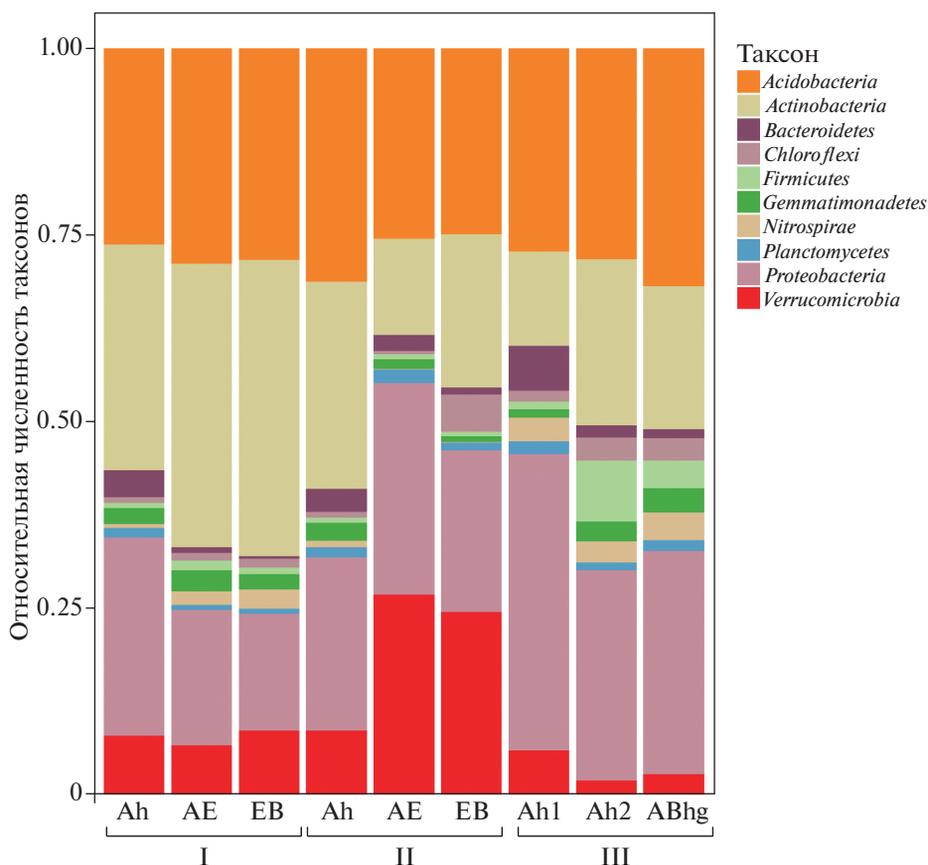


Рис. 3. Структура микробных сообществ почв разных позиций склонового ландшафта на уровне филумов (приведены данные для классов с представленностью больше 0.5%).

лось более 95% от сообщества (рис. 3). Доля *Acidobacteria* (до 24%) практически не менялась вне зависимости от почвы и горизонта. Автономный участок ландшафта под залежью характеризовался наибольшим обилием филума *Actinobacteria* с последовательным увеличением доли этих бактерий к нижележащим горизонтам (от 24 до 34%). Доля филума *Verrucomicrobia* в подповерхностных гор. АЕ и ЕВ серой лесной почвы транзитного участка II возрастала в 3 раза по сравнению с гор. Аh. Аллювиально-луговая почва аккумулятивного участка III существенно отличалась от серой лесной почвы участков I и II снижением доли *Verrucomicrobia*, а также увеличением доли филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Филум *Bacteroidetes* характеризовался строгой приверженностью к поверхностным горизонтам, резко снижаясь на глубине ниже 20 см. Полученные результаты в целом согласуются с данными по структуре прокариотных сообществ, полученными для черноземов Каменной степи [35], подтверждая доминирование *Verrucomicrobia* в подповерхностных горизонтах (20–60 см) почв, а также приуроченность филума *Bacteroidetes* к верхним горизонтам почв.

На уровне классов 23 бактериальных таксона характеризовались относительной численностью более 0.5%, 9 из которых принадлежали к различным субгруппам ацидобактерий (рис. 4). Несмотря на то, что относительная численность филума *Acidobacteria* практически не изменялась в зависимости от глубины горизонта и положения участка в ландшафте, часть классов *Acidobacteria* существенно отличалась по вкладу в бактериальные сообщества разных генетических горизонтов исследуемых почв. Верхние горизонты почв характеризовались большей долей субгрупп *Acidobacteria* Gp4 и Gp6, тогда как с глубиной повышалась доля субгрупп Gp1 и Gp7. Доля субгруппы Gp2 возрастала в подповерхностных горизонтах почвы транзитного участка ландшафта лесной экосистемы. Распределение субгруппы Gp2 по горизонтам почв оказалось полностью идентичным классу *Spartobacteria*, ростом доли которого вызвано повышение численности филума *Verrucomicrobia* в почве транзитного участка II. Между классами Gp2 и *Spartobacteria* была выявлена статистически значимая ($P < 0.01$) линейная зависимость с коэффициентом детерминации $R^2 = 0.97$, что говорит об устойчивой экологической связи

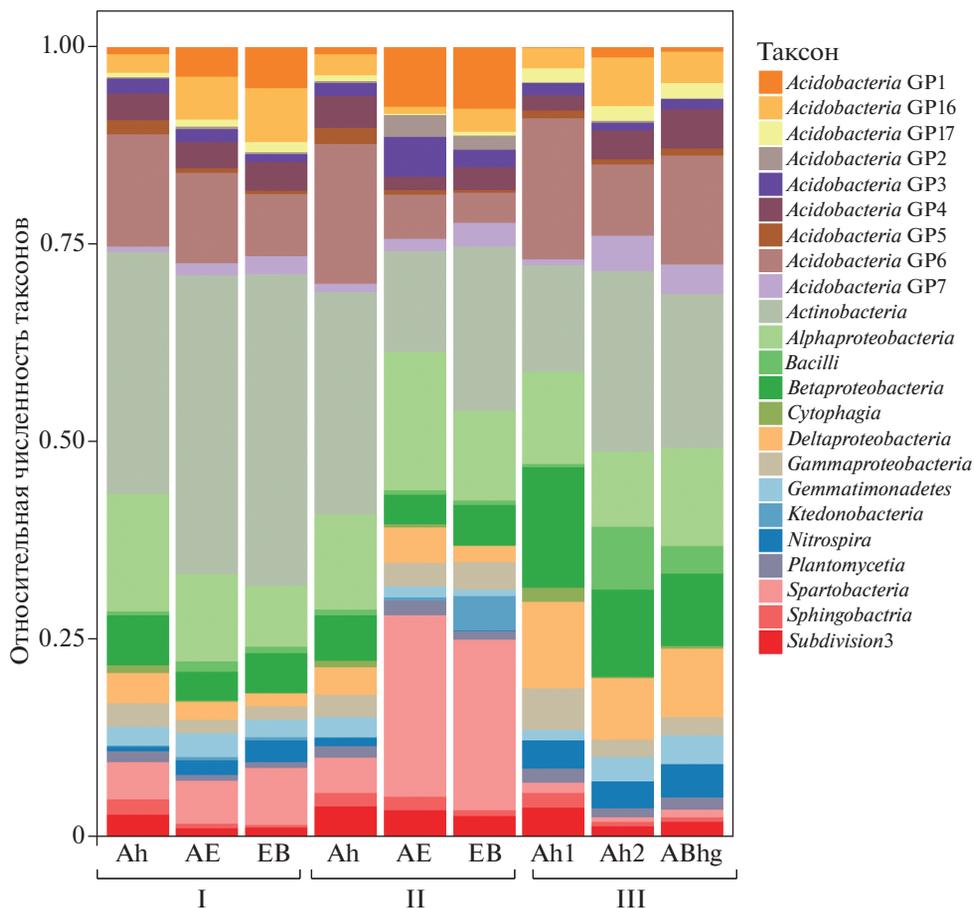


Рис. 4. Структура микробных сообществ почв разных позиций склонового ландшафта на уровне классов (приведены данные для классов с представленностью больше 0.5%).

этих двух таксонов, либо об их схожей экологии. Увеличение доли протеобактерий в микробном сообществе аллювиально-луговой почвы участка III было вызвано повышением численности β - и δ -протеобактерий, тогда как относительная численность α - и γ -протеобактерий осталась без изменений. Приуроченность филума *Bacteroidetes* к верхнему гор. А определялась распределением классов *Flaviobacteriia* и *Cytophagia*, тогда как доля *Sphingobacteriia* не имела связи с глубиной и расположением почвы в ландшафте. Представители класса *Bacteroidia* детектировались лишь в аллювиально-луговой почве.

Анализ численности наиболее представленных родов позволил выявить основных доминантов в микробных сообществах почв разных участков ландшафта (рис. 5). Ключевыми бактериальными таксонами участка I оказались представитель актинобактерий – род *Gaiella* (6–9%), а также некультивируемый род *Spartobacteria* genera incertae sedis (4–6%) и ацидобактерий Gp6 (5–9%) и Gp16 (1.5–5%). Верхний горизонт транзитного участка II отличался обилием родов *Acinetobacter*, *Gemmatimonas*, Gp7 и *Sphingomonas*. Абсолютным доминантом в

подповерхностных горизонтах (AE и EB) транзитного участка II оказался род *Spartobacteria* genera incertae sedis, относительная численность которого достигала более 20% от всех идентифицируемых родов. В микробном сообществе аллювиально-луговой почвы аккумулятивного участка III доминировали роды *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, ацидобактерии групп Gp2, Gp21, Gp22 и Gp6. Кроме того, выявлено наибольшее количество родов архей-метаногенов: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanocella*, *Methanolinella*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanoregula*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanotherix*. Низкой долей характеризовались многие роды, типичные для серой лесной почвы: *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Mycobacterium*, *Reyranella*, *Streptomyces* и *Spartobacteria* genera incertae sedis. Таким образом, аллювиально-луговая почва существенно отличалась от серой лесной почвы автономного и транзитного участков по таксономическому составу микробных сообществ, в котором доминировали облигатные анаэробы: метаногены, денитрификаторы, сульфатредукторы и микроорганизмы цикла железа. Данный сдвиг в структуре микробных со-

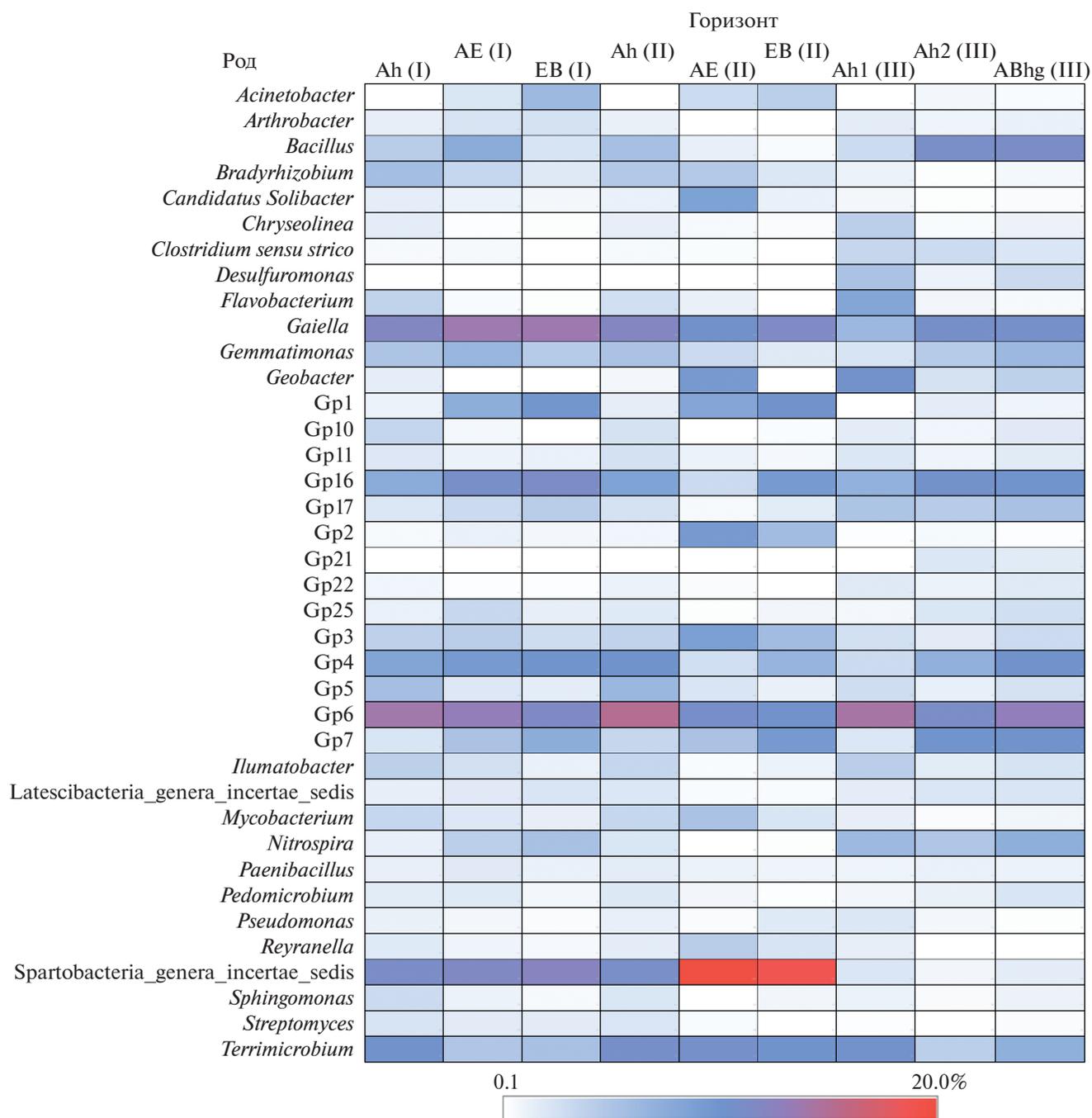


Рис. 5. Тепловая карта, иллюстрирующая представленность доминирующих родов бактерий в составе микробных сообществ почв разных позиций склонового ландшафта.

обществ вызван систематическим переувлажнением, приводящим к развитию анаэробных зон, а также активному накоплению органического углерода и других биогенных элементов в аккумулятивном участке ландшафта. Оба фактора являются следствием положения почвы в мезорельефе, которое определяет структуру и активность почвенных микробных сообществ. Накопление органического вещества является причиной ро-

ста эмиссии диоксида углерода, а высокая численность и разнообразие метаногенов и денитрификаторов объясняют увеличение потока метана и закиси азота в почве аккумулятивного участка катены [5].

α-Разнообразие микробных сообществ почв катены. Наличие большого количества видов на образце позволило выделить несколько тысяч ОТЕ в каждом из генетических горизонтов исследуе-

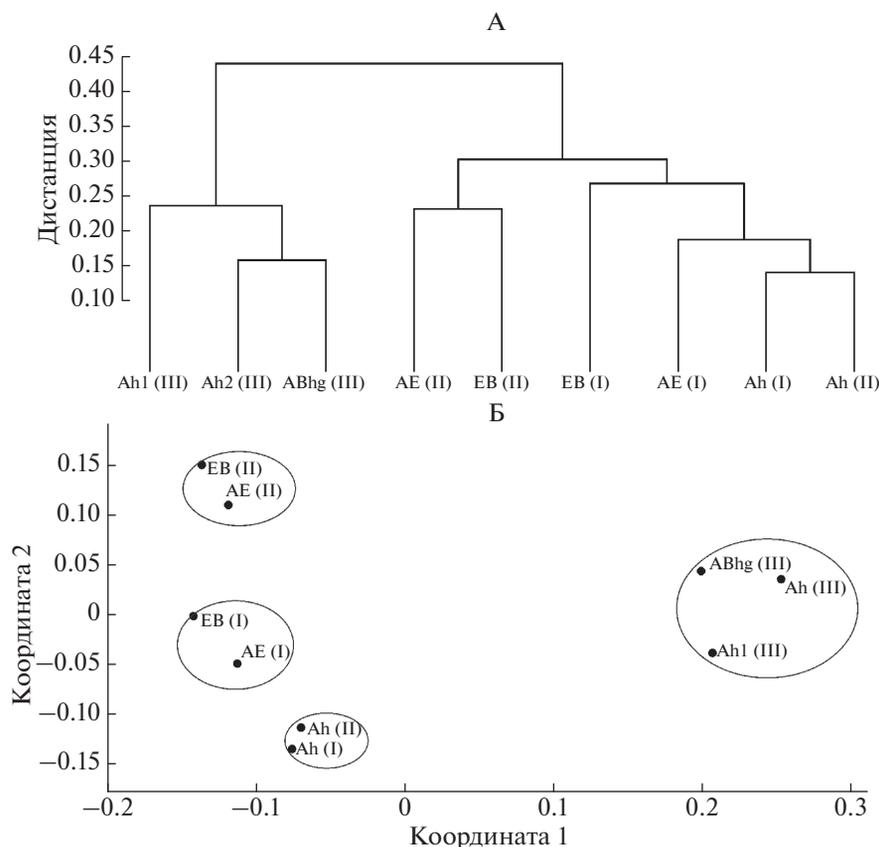


Рис. 6. β -Разнообразие микробиомов почв катены по методу unweighted UniFrac: А – дендрограмма сходства, Б – кластеризация на двухмерной плоскости методом unweighted UniFrac.

мых почв катены. Количество ОТЕ ожидаемо снижалось с глубиной, а также увеличивалось в нижней части склона (участок III) с максимумом в гор. Ah1 – 4480. Индекс Шеннона и Chao1 также уменьшались вниз по профилю и имели максимальное значение (10.11 и 5289 соответственно) в верхнем горизонте участка III. Как и численность метаболически активных архей и бактерий, количество ОТЕ значимо коррелировало со значениями C/N ($R^2 = 0.85$, $P < 0.01$), $C_{орг}$ ($R^2 = 0.76$, $P < 0.05$) и $N_{общ}$ ($R^2 = 0.79$, $P < 0.05$). При этом, величина pH почвы никак не влияла на количество ОТЕ и общее α -разнообразие микробных сообществ. Полученные результаты опровергают гипотезу о pH почвы как ведущем факторе, определяющем структуру и разнообразие микробных сообществ [20, 21]. Несмотря на очевидную роль pH в экологии и физиологии микроорганизмов, данный фактор вряд ли можно назвать решающим, а высокая корреляция pH с показателями микробных сообществ часто может быть объяснена сопутствующей корреляцией реакции среды с такими ключевыми показателями почвы, как содержание углерода и азота, гранулометрический состав почвы.

β -разнообразие микробных сообществ почв катены. Степень схожести микробных сообществ почв катены оценивали с помощью кластерного анализа и неметрического многомерного шкалирования по метрике unweighted и weighted UniFrac. Поскольку оба метода показали идентичные результаты, в данном разделе использовали результаты unweighted UniFrac (состав таксонов без учета их представленности), демонстрирующие наиболее яркие закономерности распределения микробных сообществ.

Выявлено два основных кластера наиболее сильно различавшихся групп образцов (рис. 6). В первую группу вошли горизонты серой лесной почвы автономного и транзитного участков склона (участки I и II), во вторую – горизонты аллювиально-луговой почвы участка III. В рамках первого кластера выделены три подкластера: 1) верхние гор. Ah участков I и II, 2) подповерхностные горизонты участка I и 3) подповерхностные горизонты участка II. Такое распределение по кластерам может быть объяснено спецификой свойств почвы и растительностью, доминирующей в экосистемах залежи и леса. Подповерхностные горизонты почвы транзитного участка склона под лесом на глубине 20–60 см отличаются высокой

Таблица 2. Показатели α -разнообразия почв разных позиций склонового ландшафта

Горизонт	Количество ОТЕ	Индекс Шеннона	Индекс Chao1
Автономная			
Ah	3685	9.7	4334
AE	3515	9.14	4098
EB	2193	8.24	2735
Транзитная			
Ah	3658	9.64	4361
AE	2703	8.18	3328
EB	2297	8.13	2792
Аккумулятивная			
Ah1	4480	10.11	5289
Ah2	4237	8.97	5311
ABhg	4128	9.44	5255

представленностью *Verrucomicrobia* и других микроорганизмов, ассоциированных с корнями древесных растений, что предопределяет общие структурные различия в таксономическом составе микробных сообществ серой лесной почвы под залежью и лесом. Из этого следует, что структура почвенного микробиома в пределах ландшафта формируется под влиянием не только физико-химических свойств почвы, но и флористического состава растительности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Почвы автономного, транзитного и аккумулятивного участков склонового ландшафта контрастно различались по своему микробиологическому состоянию, демонстрируя отчетливую пространственную вариабельность в масштабах мезорельефа. Содержание микробной биомассы, численность архей и бактерий, количество ОТЕ, индексы α -разнообразия последовательно увеличивались от верхнего автономного участка склона к нижнему аккумулятивному. Содержание органического углерода и общего азота было более значимым фактором формирования микробного сообщества почв катены, чем рН почвенной среды.

Аллювиально-луговая почва аккумулятивной позиции ландшафта существенно отличалась от серой лесной почвы автономного и транзитного участков не только по численности, но и по таксономическому составу микробных сообществ, в котором доминировали облигатные анаэробы: метаногены, денитрификаторы, сульфатредукторы и микроорганизмы цикла железа. Данный сдвиг в структуре микробных сообществ вызван систематическим переувлажнением, а также ак-

тивным накоплением органического углерода и других биогенных элементов, что характерно для аккумулятивной части склона. Таким образом, местоположение в склоновом ландшафте выступает одним из ключевых почвенно-экологических факторов в биогеографии почвенных микробных сообществ.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность главному научному сотруднику Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН В.М. Семенову за помощь при выборе участков склонового ландшафта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 17-76-00002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Благодатская Е.В., Семенов М.В., Якушев А.В.* Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. 243 с.
2. *Железова А.Д., Кутюкова О.В., Дмитренко В.Н., Тхакахова А.К., Хохлов С.Ф.* Оценка количества ДНК разных групп микроорганизмов в генетических горизонтах темно-серой почвы // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2015. № 78. С. 87–98.
3. *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.
4. *Семенов В.М., Когут Б.М., Зинякова Н.Б., Масютенко Н.П., Малюкова Л.С., Лебедева Т.Н., Тулина А.С.* Биологически активное органическое вещество в почвах европейской части России // Почвоведение. 2018. № 4. С. 457–472. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1804007X>
5. *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.
6. *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.
7. *Хитров Н.Б.* Связь почв солонцового комплекса Северного Прикаспия с микрорельефом // Почвоведение. 2005. № 3. С. 271–284.
8. *Чернов Т.И., Лебедева М.П., Тхакахова А.К., Кутюкова О.В.* Профильный анализ микробиомов сопряженных почв солонцового комплекса Прикаспийской низменности // Почвоведение. 2017. № 1. С. 71–76. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1701004X>

9. *Amann R.I., Ludwig W.* Ribosomal RNA targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. V. 24. P. 555–565.
10. *Anderson T.H.* Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality // *Agric. Ecosyst. Environ.* 2003. V. 98 (1–3). P. 285–293.
11. *Angel R., Claus P., Conrad R.* Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions // *ISME J.* 2012. V. 6. P. 847–862.
12. *Ascher J., Sartori G., Graefe U., Thornton B., Ceccherini M.T., Pietramellara G., Egli M.* Are humus forms, mesofauna and microflora in subalpine forest soils sensitive to thermal conditions? // *Biol. Fertil. Soils.* 2012. V. 48. P. 709–725.
13. *Barbosa W.R., Romero R.E., de Souza Junior V.S., Cooper M., Sartor L.R., de Moya Partiti C.S., de Oliveira Jorge F., Cohen R., de Jesus S.L., Ferreira T.O.* Effects of slope orientation on pedogenesis of altimontane soils from the Brazilian semi-arid region (Baturité massif, Ceará) // *Environ. Earth Sci.* 2016. V. 73. № 7. P. 3731–3743.
14. *Bardelli T., Ascher-Jenull J., Stocker E.B., Fornasier F., Arfaioli P., Fravolini G., Alves Medeiros L.R., Egli M., Pietramellara G., Insam H., Gómez-Brandón M.* Impact of slope exposure on chemical and microbiological properties of Norway spruce deadwood and underlying soil during early stages of decomposition in the Italian Alps // *Catena.* 2018. V. 167. P. 100–115.
15. *Bardelli T., Gómez-Brandón M., Ascher-Jenull J., Fornasier F., Arfaioli P., Francioli D., Egli M., Sartori G., Insam H., Pietramellara G.* Effects of slope exposure on soil physico-chemical and microbiological properties along an altitudinal climosequence in the Italian Alps // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 575. P. 1041–1055.
16. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. methods.* 2010. V. 7. P. 335–336.
17. *Carletti P., Vendramin E., Pizzeghello D., Concheri G., Zanella A., Nardi S., Squartini A.* Soil humic compounds and microbial communities in six spruce forests as function of parent material, slope aspect and stand age // *Plant Soil.* 2009. 315. 47–65.
18. *Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H., Wagner M.* The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set // *Systematic Appl. Microbiol.* 1999. V. 22. P. 434–444.
19. *Eilers K.G., Debenport S., Anderson S., Fierer N.* Digging deeper to find unique microbial communities: the strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 50. P. 58–65.
20. *Fierer N., Jackson R.B.* The diversity and biogeography of soil bacterial communities // *P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 626–631.
21. *Hackl E., Pfeffer M., Dona C., Bachmann G., Zechmeister-Boltenstern S.* Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest // *Soil Biol. Biochem.* 2005. V. 37. P. 661–671.
22. *He J.-Z., Shen J.-P., Zhang L.-M., Zhu Y.-G., Zheng Y.-M., Xu M.-G., Di H.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 2364–2374.
23. *Kemnitz D., Kolb S., Conrad R.* High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 60. P. 442–448.
24. *Khalili-Rad M., Nourbakhsh F., Jalalian A., Eghbal M.K.* The effects of slope position on soil biological properties in an eroded toposequence // *Arid Land Res. Manag.* 2011. V. 25(3). P. 308–312.
25. *Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41(1). P. e1–e1.
26. *Kravchenko A.N., Bullock D.G.* Correlation of corn and soybean grain yield with topography and soil properties // *Agron. J.* 2000. V. 92(1). P. 75–83.
27. *Lee Z.M.P., Bussema C., Schmidt T.M.* rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37 (suppl 1). P. D489–D493.
28. *Loeppmann S., Semenov M., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y.* Substrate quality affects microbial- and enzyme activities in rooted soil // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2016. V. 179. P. 39–47.
<https://doi.org/10.1002/jpln.201400518>
29. *Loeppmann S., Semenov M., Kuzyakov Y., Blagodatskaya E.* Shift from dormancy to microbial growth revealed by RNA: DNA ratio // *Ecol. Indic.* 2018. V. 85. P. 603–612.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.11.020>
30. *Lozupone C., Lladser M.E., Knights D., Stombaugh J., Knight R.* UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison // *The ISME J.* 2011. V. 5. P. 169.
31. *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. 83(5). P. 674–683.
<https://doi.org/10.1134/S002626171405018X>
32. *Nahidan S., Nourbakhsh F., Henneberger R., Lazzaro A., Zeyer J.* Aggregate Size Distribution of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea at Different Landscape Positions // *Geomicrobiol. J.* 2017. V. 34(10). P. 895–902.
33. *Pachepsky Y.A., Timlin D.J., Rawls W.J.* Soil water retention as related to topographic variables // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2001. V. 65(6). P. 1787–1795.
34. *Rooney-Varga J.N., Giewat M.W., Duddleston K.N., Chanton J.P., Hines M.E.* Links between archaeal community structure, vegetation type and methanogenic pathway in Alaskan peatlands // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 60. P. 240–251.
35. *Semenov M.V., Chernov T.I., Tkhakakhova A.K., Zhelezova A.D., Ivanova E.A., Kolganova T.V., Kutovaya O.V.* Distribution of prokaryotic communities throughout the Chernozem profiles under different

- land uses for over a century // *Appl. Soil Ecol.* 2018. V. 127. P. 8–18.
36. *Semenov M., Blagodatskaya E., Stepanov A., Kuzyakov Y.* DNA-based determination of soil microbial biomass in alkaline and carbonaceous soils of semi-arid climate // *J. Arid Environ.* 2018. V. 150. P. 54–61.
37. *Teira E., Reinthaler T., Peinthaler A., Peinthaler J., Herndl G.J.* Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by Bacteria and Archaea in the deep ocean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 4411–4414.
38. *Timonen S., Bomberg M.* Archaea in dry soil environments // *Phytochem. Rev.* 2009. V. 8. P. 505–518.
39. *Tsui C.C., Chen Z.-S., Hsieh C.F.* Relationships between soil properties and slope position in a lowland rain forest of southern Taiwan // *Geoderma.* 2004. V. 123. P. 131–142.
40. *Valentine D.L.* Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea // *Nature Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. P. 316–323.

Biomass and Taxonomic Structure of Microbial Communities in Soils of the Right Bank of the Oka River

M. V. Semenov^{a,*}, N. A. Manucharova^b, G. S. Krasnov^c, D. A. Nikitin^{a,b}, and A. L. Stepanov^b

^a*Dokuchaev Soil Science Institute, Pyzhevskii per. 7, Moscow, 119017 Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia*

^c*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: mikhail.v.semenov@gmail.com

Data on the microbial biomass content and abundance and taxonomic structure of bacterial and archaeal communities in the upper horizons of gray forest (Eutric Retisol (Loamic, Cutanic, Humic)) and alluvial-meadow (Fluvic Gleyic Phaeozem (Loamic, Pachic)) soils of the autonomous, transitional and accumulative sites of the slope landscape, corresponding to the fallow, small-leaved forest, and meadow ecosystems are presented. Soil microbial biomass was measured by DNA quantification and chloroform fumigation extraction; the archaeal and bacterial abundances were estimated using the FISH method; and microbial communities were analyzed via high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing (DNA metabarcoding). The microbial biomass and the abundances of metabolically active bacterial and archaeal cells correlated with the organic carbon (C_{org}) and total nitrogen (N_{tot}) contents, increasing along the slope from the autonomous to accumulative landscape site, and decreasing with depth. The alluvial-meadow soil of the accumulative landscape site was characterized by a sharp decrease in the relative abundance of Verrucomicrobia, as well as by the increase in the relative abundance of Proteobacteria and Firmicutes compared to the gray forest soil of the autonomous and transitional sites. The number of operational taxonomic units and α -diversity indices correlated significantly with C / N, C_{org}, and N_{tot} and were almost unaffected by the soil pH. Thus, the location in the landscape determines not only the physicochemical but also the microbiological properties of the soil, forming the spatial heterogeneity of the microbial community structure and abundance on the scale of the mesorelief.

Keywords: catena, bacteria, archaea, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), DNA metabarcoding