

## **ПОЛНОПРОФИЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОМА ЦЕЛИННОГО СВЕТЛОГО СОЛОНЦА ДЖАНЫБЕКСКОГО СТАЦИОНАРА**

**© 2015 г. Т. И. Чернов, А. К. Тхакахова,  
М. П. Лебедева, О. В. Кутюва**

*Почвенный институт им. В.В. Докучаева,  
119017, Москва, Пыжевский пер., 7, стр. 2  
e-mail: chern-off@mail.ru*

Проведено исследование структуры микробиома целинного светлого гидрометаморфизованного мелкого солонца с использованием молекулярно-генетических (анализ прокариотного метагенома) и культуральных методов. Выявлена резкая дифференциация прокариотного разнообразия (по количеству OTU, индексу Шеннона и Chao1) по профилю. Отмечаются общие черты микробиомов солонцового горизонта и нижней части профиля (низкое биоразнообразие, доминирование некоторых представителей филума *Proteobacteria*). Необычно высокую (почти 20% сообщества) долю в надсолонцовом горизонте почвы занимают археи группы *Thaumarchaeota*.

*Ключевые слова:* солонцы, метагеном, почвенные микроорганизмы, пиросеквенирование, 16S рПНК, *Archaea*, биоразнообразие.

Микробиологические комплексы аридных почв, в том числе засоленных, мало исследованы, и многие вопросы, связанные с разнообразием, функционированием и вариабельностью микробных сообществ аридных почв еще далеки от понимания. Интерес исследователей, как правило, привлекают верхние горизонты почвы, в которых протекают основные биохимические процессы, связанные с трансформацией органических веществ (Microbiology of extreme soils, 2008; Першина и др., 2012). Однако глубокие горизонты аридных почв, бедные органическим веществом, часто засоленные, представляют не меньший интерес с точки зрения выявления факторов, определяющих структуру микробных сообществ почв. Анализ полного профиля аридных почв по горизонтам до 150 см в отечественной и зарубежной литературе отсут-

ствуется. В связи с этим было предпринято исследование микробиома профиля целинного солонца на территории Джаныбекского стационара Института лесоведения РАН.

В работе проведена попытка сравнительного анализа микробных сообществ почвенных горизонтов в пределах профиля целинного светлого гидрометамерфизованного мелкого солончакового солонца (по Классификации почв, 2004) с использованием классических методов посева на питательные среды и молекулярно-биологических методов – анализа прокариотного метагенома.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Джаныбекский стационар расположен в северной части Прикаспийской низменности в пределах Волго-Уральского междуречья, на абсолютных отметках 25–28 м над ур. м. Данная территория расположена в суббореальном поясе. Низкое количество осадков (250–350 мм) и высокая испаряемость (около 1000 мм) определяют семиаридный тип климата. Территория представляет практически бессточную равнину, сложенную однородными тяжелыми бурыми лёссовидными карбонатными суглинками хвалынского возраста, глубже 15 м переходящими в глины, с прослоями супесей и песков (Роде, Польский, 1961). Уровень грунтовых вод на начало XXI в. составляет 4–5 м (Сапанов, 2007).

Объектом исследования являлся профиль солонца (разр. 7М-13), разрез заложен к западу от “Госфонда” на территории Джаныбекского стационара Института лесоведения РАН (N 49.39943°, E 46.81062°) на целинном участке. Растительность представлена мятликом луковичным (*Poa bulbosa*), перечником (*Lepidium perfoliatum*), полынком (*Artemisia austriaca*), прутняком (*Kochia prostrata*). Вскипает с 15 см. Уровень грунтовых вод 4.74 м. Ранее морфологические, микроморфологические и химические особенности изученного разреза более подробно рассмотрены в работе Лебедевой и Конюшковой (2011). В ходе полевого описания почвы были выделены следующие горизонты:

АУЕЛ, 0–7(10) см. Светло-палево-серый, сверху вниз отмечается изменение структуры: в верхней части – чешуйчато-линзовидный, к низу – комковатый. Сухой, легкосуглинистый тонкопылеватый, слегка уплотненный. Корни растений распределены в виде розеток. Переход постепенный, граница волнистая.

BSN, 7(10)–14 см. Неоднородная окраска: палево-белесые зоны приурочены к верхней части плотных призматических структурных отдельностей, которые на изломе имеют кофейно-серый цвет. Сухой. Большое количество корней разного размера как крупных, так и мелких. Тонкопористый, среднесуглинистый. На срезе в горизонте видны мелкие железистые конкреции и примазки. На корнях растений висят бусины остросереберных мелких агрегатов. Переход заметный по плотности, цвету и структуре.

BSNbc, 14–24(26) см. Кофейный, очень плотный. Структура призматическая с делимостью на отдельные угловатые агрегаты при приложении силы. Тяжелосуглинистый, свежий. Переход постепенный по цвету и плотности.

BSNs, bc, 24(26)–33(36) см. Бурый, с кофейными по цвету кутанами на гранях структурных отдельностей. Структура уплощенно-призматическая. Менее плотный, среднесуглинистый, свежий. В нижней части появляются гипсовые прожилки и мелкие карбонатные пятна, которые распределены гнездами. Переход заметный по появлению большого количества солевых новообразований.

BCAs, 33(36)–57 см. Неоднородная окраска: на буром фоне в отдельных зонах встречается большое количество пятен и прожилок белого и палевого цвета – гипсовые и карбонатные новообразования. Менее плотный и более свежий по сравнению с вышележащим горизонтом. Классический (по Роде, Польскому, 1961) псевдопесчаный среднесуглинистый подсолонцовый горизонт. Структура непрочнотельчатая, встречается биогенное заполнение ходов. Переход заметный по цвету и уменьшению количества солевых новообразований.

BCs, 57–100 см. Желтовато-бурый, более влажный и менее плотный, глыбистый, с редкими разбросанными округлыми стяжениями (диаметром до 1 см) из мелких кристаллов гипса, по отдельным ходам отчетливо видны солевые заполнения. Структура уплощенно-глыбистая. Среднесуглинистый, граница волнистая. Переход заметный по уменьшению округлых солевых стяжений.

BC, 100–150 см. Светло-желтовато-палевый. Увлажненный среднесуглинистый. Структура глыбистая непрочная, характерны редкие округлые солевые стяжения. Хрустит под ножом.

Почва была определена как целинный светлый гидрометаморфизованный мелкий солонец (Классификации и диагностика почв России, 2004), *Episalic Solonetz* (World Reference Base for Soil Resources, 2006).

Образцы для молекулярно-биологического анализа отбирали из средних частей генетических горизонтов, хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . ДНК выделяли из 0.5 г почвы после механического разрушения с использованием стеклянных шариков в экстрагирующем буфере, содержащем 350 мкл раствора А (натрий-фосфатный буфер – 200 мМ, изоцианат гуанидина – 240 мМ, рН 7), 350 мкл раствора Б (Трис- $\text{HCl}$  – 500 мМ, SDS – 1% по массе к объему, рН 7) и 400 мкл смеси фенола с хлороформом (1 : 1). Разрушение образца проводили в течение 40 с на гомогенизаторе Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) при максимальной мощности (скорость 6500 об./мин). Полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 16000 об./мин. Водную фазу отбирали и повторно экстрагировали хлороформом. ДНК осаждали, добавляя равный объем изопропилового спирта. После центрифугирования осадок промывали 70%-ным раствором этанола и далее растворяли в воде при температуре  $65^{\circ}\text{C}$  в течении 5–10 мин. Очистку ДНК проводили с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим выделением ДНК из геля методом сорбции на оксиде кремния (Андронов и др., 2011).

Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с использованием пары универсальных праймеров к вариабельному участку V4 гена 16S рРНК – F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) (Bates et al., 2010). В праймеры вводили олигонуклеотидные идентификаторы и служебные последовательности, необходимые для пиросеквенирования по протоколу фирмы “Roche” (Швейцария). Подготовку проб и секвенирование выполняли на приборе GSJunior (“Roche”, Швейцария) согласно рекомендациям производителя.

Для каждого образца получали не менее 2000 сиквенсов. Обработку данных проводили при помощи программы QIIME (Caporaso et al., 2010). Осуществляли проверку качества и фильтрации сиквенсов (нуклеотидных последовательностей), объединение сиквенсов в операционные таксономические единицы (ОТЕ, заменяющие в метагеномных исследованиях прокариот понятие вида) на основе 97% порога сходства, определение таксономического положения ОТЕ с использованием базы данных RDP

(<http://rdp.cme.msu.edu>). Таксономическую структуру сообщества оценивали по долям ОТЕ, отнесенным к различным таксонам.

Разнообразие прокариотных сообществ различных горизонтов оценивали по нескольким показателям: количеству выделенных ОТЕ ( $S_{obs}$ , аналог видового богатства), индексу Шеннона ( $H = -\sum_{i=1}^S p_i \log p_i$ , где  $p_i$  – доля  $i$ -го вида в сообществе) и индексу Chao1, оценивающему предположительное реальное количество ОТЕ в сообществе ( $Chao1 = S_{obs} + \frac{a^2}{2b}$ , где  $S_{obs}$  – число обнаруженных ОТЕ,  $a$  – число ОТЕ, содержащих 1 сиквенс,  $b$  – число ОТЕ, содержащих 2 сиквенса). При расчете индексов разнообразия проводили нормализацию данных до 2165 сиквенсов на образец.

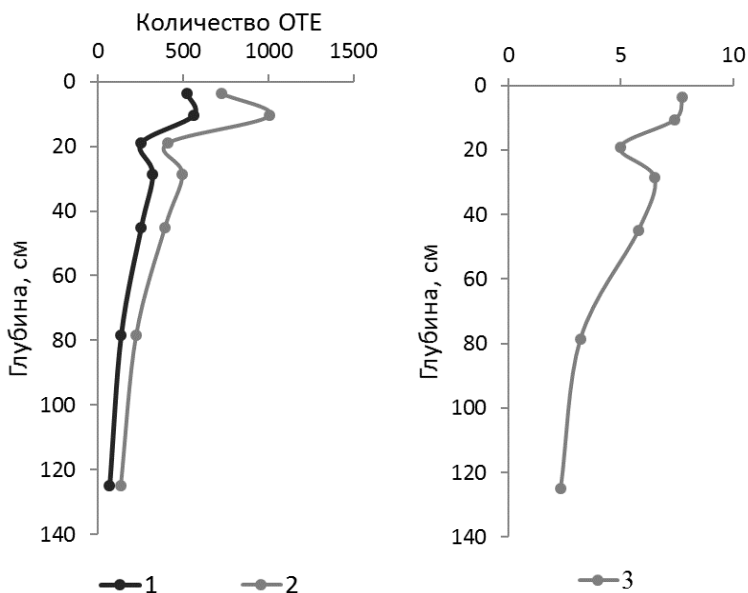
Образцы для культурального исследования хранили при температуре +4°C. Посев проводили на среды следующего состава (в расчете на 1 л): КАА (крахмало-аммиачный агар):  $(NH_4)_2SO_4$  – 2 г,  $K_2HPO_4$  – 1 г,  $MgSO_4$  – 1 г, NaCl – 1 г,  $CaCO_3$  – 3 г, крахмал – 10 г, агар-агар – 20 г; среда Чапека:  $KH_2PO_4$  – 1 г,  $MgSO_4$  – 0.5 г, KCl – 0.5 г,  $FeSO_4$  – 0.01 г,  $NaNO_3$  – 3 г, глюкоза или сахароза – 30 г, молочная кислота – 4 мл, агар-агар – 20 г; среда Эшби:  $KH_2PO_4$  – 0.2 г,  $MgSO_4$  – 0.2 г, NaCl – 0.2 г,  $CaCO_3$  – 3 г,  $K_2SO_4$  – 0.1 г, сахар (маннит) – 10–15 г, агар-агар – 20 г; среда Виноградского:  $K_2HPO_4$  – 0.5 г,  $MgSO_4$  – 0.5 г, NaCl,  $FeSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $CaCO_3$  – следовые количества; МПА (мясо-пептонный агар): мясной бульон – 1 л, пептон – 10 г, NaCl – 5 г, агар-агар – 2–2.5%, pH 7.6–7.8. После инкубации от 3 до 14 дней (в зависимости от используемой питательной среды) проводили подсчет КОЕ (колониеобразующих единиц) с пересчетом на 1 г почвы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ показателей разнообразия (рис. 1) продемонстрировал постепенное снижение обилия прокариотного сообщества с глубиной. В нижней части профиля (гор. ВС) предположительное видовое богатство сообщества, оцениваемое по индексу Chao1, составляло всего 130 видов (ОТЕ). На фоне постепенного снижения вниз по профилю, наблюдается резкое уменьшение биоразнообразия в гор. BSNbc (индекс Шеннона изменяется с 7.4 до 5.0; число обнаруженных ОТЕ – с 560 до 253 относительно предыдущего гор. BSN). Известно, что солонцовые горизонты характери-

зуются неблагоприятными свойствами для развития как природной растительности и ее видового разнообразия, так и для сельскохозяйственных культур (Роде, Польский, 1961). По данным анализа индексов разнообразия, для большей части микробного сообщества условия солонцового горизонта также являются неблагоприятными. Эти данные представляются интересными, учитывая то, что содержание гумуса и pH (одни из основных факторов, влияющих на структуру почвенного микробиома) в гор. BSNbc мало отличаются от таковых в гор. BSN (таблица). Представляется вероятным, что в данном случае небольшое разнообразие микробиоты связано с влиянием других факторов, например, с высоким содержанием обменного натрия или высокой плотностью гор. BSNbc.

На рис. 2 представлена таксономическая структура прокариотных микробиомов разных горизонтов на уровне филумов. Необ-



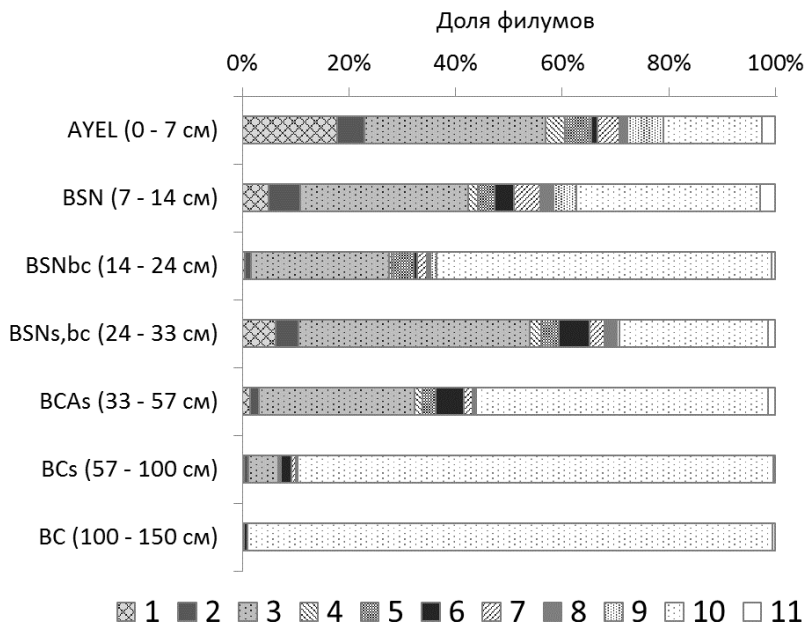
**Рис. 1.** Значения показателей биоразнообразия: 1 – количества обнаруженных ОТЕ, 2 – индекса Chao1 (предположительное количество ОТЕ в сообществе), 3 – индекса Шеннона в генетических горизонтах профиля целинного светлого солонца.

Результаты химического анализа целинного светлого солонца

| Глубина, см | pH H <sub>2</sub> O | Гумус, % | Обменные основания,<br>ммоль-экв/100 г |                  |                 |                |       | Na <sup>+</sup> | Mg <sup>2+</sup> |
|-------------|---------------------|----------|----------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|-------|-----------------|------------------|
|             |                     |          | Ca <sup>2+</sup>                       | Mg <sup>2+</sup> | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | сумма | % от суммы      |                  |
| 0–7         | 7.17                | 1.51     | 5.36                                   | 2.64             | 0.69            | 0.83           | 9.52  | 7.25            | 27.73            |
| 7–14        | 8.11                | 1.09     | 4.68                                   | 5.36             | 5.82            | 0.39           | 16.25 | 35.82           | 32.98            |
| 14–24       | 8.14                | 1.82     | 2.48                                   | 9.65             | 10.11           | 0.52           | 22.76 | 44.42           | 42.40            |
| 24–33       | 8.34                | –        | 1.6                                    | 10.42            | 8.94            | 0.52           | 21.48 | 41.62           | 48.51            |
| 33–57       | 8.61                | –        | 2.27                                   | 6.92             | 7.09            | 0.44           | 16.72 | 42.40           | 41.39            |
| 57–100      | 8.86                | –        | 2.6                                    | 5.12             | 6.62            | 0.35           | 14.69 | 45.06           | 34.85            |
| 100–141     | 8.77                | –        | 2.37                                   | 5.82             | 6.68            | 0.36           | 15.23 | 43.86           | 38.21            |
| 140–160     | 8.85                | –        | 2.55                                   | 6.13             | 7.07            | 0.35           | 16.1  | 43.91           | 38.07            |

ходимо отметить большую (почти 18% в верхнем горизонте) долю сиквенсов, относящихся к группе *Thaumarchaeota* домена *Archaea*. Представители этой группы архей считаются активными окислителями аммония и часто обнаруживаются в почве, но, как правило, они определяются как минорные компоненты прокариотного сообщества и редко составляют такую существенную часть почвенного микробиома, как в изученном солонце.

Хорошо заметна обратная связь между общим разнообразием и долей представителей филума *Proteobacteria* – чем меньше таксономическое разнообразие сообщества, тем большую его долю занимают протеобактерии; в нижнем горизонте, где видовой состав ограничен всего 67 ОТЕ, около 98% сиквенсов относятся к протеобактериям. По всей видимости, некоторые представители этого филума в данной почве способны выживать в неблагоприятных условиях (низкое содержание органических веществ, высокое содержание солей), в которых из-за сокращения численности других микроорганизмов они оказываются доминантами. Более наглядная зависимость доли некоторых родов прокариот от глубины генетических горизонтов показана на рис. 3. Доли родов *Candidatus Nitrososphaera* (домен *Archaea*), *Streptomyces*, *Bacillus* и *Rhodoplanes* (взяты для примера роды с хорошей представленностью) в целом соответствуют общему разнообразию – минимальные значения в гор. BSNbc и в нижней части профилля.

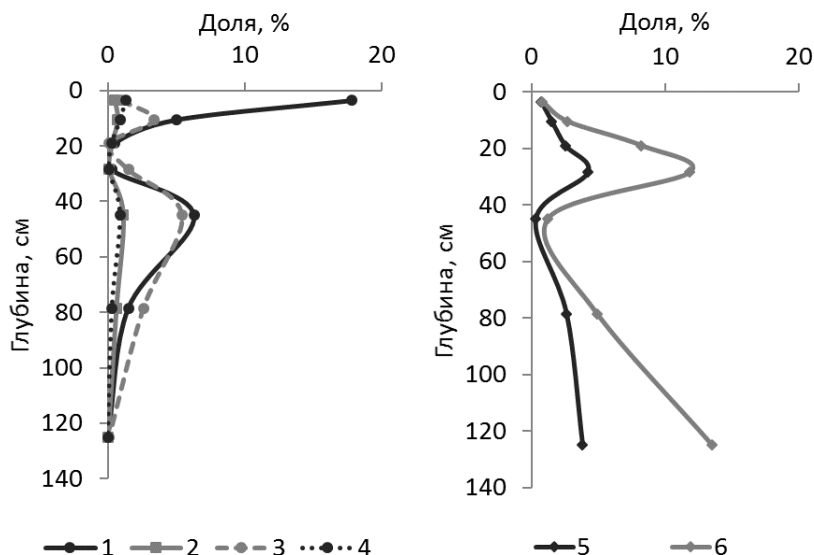


**Рис. 2.** Таксономическая структура микробиомов почвенных горизонтов целинного светлого солонца, доля сиквенсов, относящихся к филумам: 1 – *Thaumarchaeota*, 2 – *Acidobacteria*, 3 – *Actinobacteria*, 4 – *Bacteroidetes*, 5 – *Chloroflexi*, 6 – *Firmicutes*, 7 – *Gemmatimonadetes*, 8 – *Planctomycetes*, 9 – *Verrucomicrobia*, 10 – *Proteobacteria*, 11 – другие.

Напротив, доли родов *Sphingomonas* и *Pseudomonas*, относящихся к протеобактериям, демонстрируют ровно противоположную зависимость – они достигают максимальных значений в гор. BSNbc и BC, а в горизонтах с высоким биоразнообразием крайне малы.

На рис. 4 приведены значения численности культивируемых групп микроорганизмов. Некоторые эколого-трофические группы присутствуют лишь в верхних горизонтах исследованной почвы (до 50 см), а в нижних методом посева не обнаруживаются. Это амилोलитики и мицелиальные организмы (грибы и актиномицеты), функции которых в почве связаны, как правило, с разрушением органических полимеров, которые редки в глубоких горизонтах почвы. Примечательно, что по результатам посева не наблюдается такого резкого сокращения численности в солонцовом горизонте по сравнению



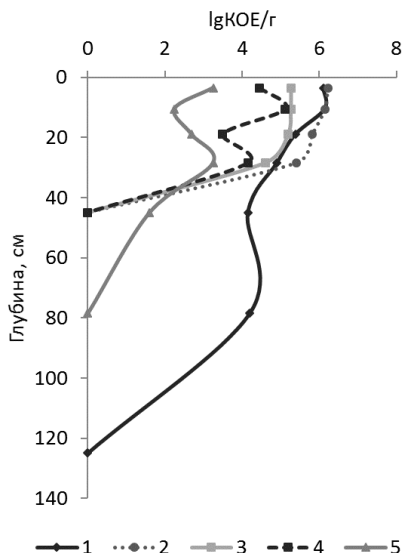


**Рис. 3.** Профильное распределение некоторых родов прокариот: 1 – *Candidatus Nitrososphaera*, 2 – *Streptomyces*, 3 – *Bacillus*, 4 – *Rhodoplanes*, 5 – *Sphingomonas*, 6 – *Pseudomonas*.

с данными метагеномного анализа. Возможно, это связано с тем, что на питательных средах культивируется лишь небольшая часть почвенной микробиоты, и большое количество редких таксонов, составляющих значительную часть микробного разнообразия, не учитывается этим методом. Кроме того, в горизонтах с более высоким разнообразием и численностью микроорганизмов КОЕ могут быть представлены не отдельными клетками и спорами, а микроколониями, что будет дополнительно занижать количество КОЕ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено полнопрофильное исследование микробного комплекса целинного светлого солонца молекулярно-биологическими методами. На фоне постепенного снижения разнообразия прокариотного комплекса с глубиной отмечается его резкое сокращение в солонцовом гор. BSNbc, характеризующемся высокой плотностью и большим содержанием обменного натрия. Обнаружена обратная связь общего разнообразия прокариотного комплек-



**Рис. 4.** Численность культивируемых микроорганизмов (lgКОЕ/г почвы) по профилю целинного светлого мелкого солонца: 1 – аммонификаторы (МПА), 2 – амилаolitikи (КАА), 3 – актиномицеты (КАА), 4 – микромицеты (среда Чапека), 5 – анаэробные азотфиксаторы или олигонитрофилы (среда Виноградского).

са с долей представителей филума *Proteobacteria* (в том числе родов *Sphingomonas* и *Pseudomonas*), в горизонтах с низким биоразнообразием (BSNbc, BCs, BC) эти таксоны являются доминирующими. В горизонтах с более высоким биоразнообразием обнаруживаются представители группы *Thaumarchaeota* домена *Archaea*, доля которых в верхнем горизонте достигала 18% от общего прокариотного комплекса. Обнаруженные различия в разнообразии и структуре микробиомов почвенных горизонтов, вероятно, обусловлены содержанием органических веществ и составом солей.

*Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-04-00918.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Выделение ДНК из образцов почвы (методические указания). СПб: ВНИИСХМ РАСХН, 2011. 27 с.

2. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
3. *Лебедева М.П., Конюшкова М.В.* Временные изменения микропризнаков в целинных и мелиорированных солонцах Джаныбекского стационара // Почвоведение. 2011. № 7. С. 1–14
4. Классификация и диагностика почв России. 2004. Ойкумена. 342 с.
5. *Першина Е.В., Тамазян Г.С., Дольник А.С., Пинаев А.Г., Сергалиев Н.Х., Андронов Е.Е.* Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования // Экологическая генетика. 2012. Т. X. № 2. С. 31–38.
6. *Роде А.А., Польский М.Н.* Почвы Джаныбекского стационара, их морфологическое строение, механический и химический состав и физические свойства // Тр. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. М.: Изд-во АН СССР, 1961. Т. 56. С. 3–214.
7. *Сапанов М.К.* Синхронность изменения уровней Каспийского моря и грунтовых вод в Северном Прикаспии во второй половине XX в. // Известия РАН. Сер. географическая. 2007. № 5. С. 82–87.
8. *Bates S., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W. A., Knight R., Fierer N.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // ISME J. 2011. № 5. P. 908–917.
9. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al.* QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // Nature methods. 2010. V. 7(5). P. 335–336.
10. Microbiology of extreme soils / Eds. Dion P., Nautiyal C.S. Berlin/Heidelberg: Springer, 2008. 369 p.
11. World Reference Base for Soil Resources. 2006, FAO, Rome. 128 p.

**A COMPREHENSIVE ANALYSIS OF THE  
MICROBIOME IN THE COMPLETE PROFILE  
OF VIRGIN LIGHT-COLORED SOLONETZ SOIL  
AT THE TERRITORY OF DZHANYBEK  
EXPERIMENTAL STATION**

**T. I. Chernov, A. K. Tkhakakhova,  
M. P. Lebedeva, O. V. Kutovaya**

V. V. Dokuchaev Soil Science Institute, 119017 Moscow, Pyzhevskii, 7, bld. 2  
e-mail: [chern-off@mail.ru](mailto:chern-off@mail.ru)

Under study was the microbiome structure in virgin light-colored hydromorphized solonetz soil by using molecular-genetic and cultural

methods. It was shown that the diversity of the microbial community is constantly decreasing down the soil profile being sharply declined in the solonetz horizon. Against the background of decreasing the biodiversity some groups of Proteobacteria are prevailed in the solonetz horizon and in the lower part of the profile. An unusually higher share of Crenarchaeota (almost 20% of the community) is observed in the topsoil.

*Keywords:* solonetz soil, metagenome, soil microorganisms, pyrosequencing, 16S pPHK, biodiversity.