

К ВОПРОСУ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И АДАПТАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ В САДОВОМ ПОЧВОВЕДЕНИИ

Попова В.П., д-р с.-х. наук, Ушакова Я.В., канд. биол. наук,
Черников Е.А., канд. с.-х. наук

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)*

Реферат. Представлены основные молекулярно-генетические методы оценки почвенного микробного разнообразия, а также перспективы их интеграции и усовершенствования для определения количественных и качественных характеристик прокариотного сообщества садовых почв. Показана необходимость разработки комплексного подхода к оценке «здоровья» садовых агроценозов для дальнейшего усовершенствования приемов воспроизводства почвенного плодородия.

Ключевые слова: почвоутомление, почвенный микробиом, садовый агроценоз, почвенная метабеномика, биологизация земледелия

Summary. The main molecular genetic methods for assessing soil microbial diversity are presented as well as the prospects for their integration and improvement to determine the quantitative and qualitative characteristics of the prokaryotic community of garden soils. The necessity of developing an integrated approach to the assessment of garden agrocenosis «health» is shown for further improvement of methods of reproduction of soil fertility.

Key words: soil fatigue, soil microbiome, garden agrocenosis, soil metagenomics, agricultural biologization

Введение. Почва – важнейшее средство производства в сельском хозяйстве, так как именно с ней связана жизнедеятельность и урожайность сельскохозяйственных растений.

Для увеличения производства отечественной продукции в садоводстве используются интенсивные технологии возделывания плодовых насаждений. Следовательно, увеличивается антропогенное воздействие на агроэкосистему сада. Повышение техногенной нагрузки на почву, длительная монокультура, однотипная агротехника и другие факторы способствуют снижению устойчивости садового ценоза, усилению деградиционных процессов и утомлению почв [1]. В связи с этим особую значимость приобретают методы, позволяющие выявить причины почвоутомления для разработки экологических и технологических ступеней перехода от интенсивного земледелия к биологизированному.

Современная почвенная микробиология занимается вопросами изучения всего комплекса населяющих почву микроорганизмов, что дает возможность обнаружить наиболее оптимальное сочетание факторов, приводящих не только к образованию плодородной почвы, но и к развитию на ней полноценного, устойчивого к стрессам фитоценоза [2].

Обсуждение результатов. Почвоутомление – негативное явление при выращивании многолетних плодовых и ягодных культур, проявляющееся в накоплении токсинов, ингибиторов роста, выделяемых корнями плодовых деревьев при монокультуре, резком обеднении почвы в зоне корнеобитаемого слоя доступными формами макроэлементов и специфическими для культуры микроэлементами, изменении микробиологической активности почв и накоплении патогенных микроорганизмов [3]. Одной из основных причин почвоутомления является развитие фитопатогенной микрофлоры и изменение в структуре почвенного микробиома. В

настоящее время актуален вопрос культивирования высокопродуктивных и максимально самодостаточных растительно-микробных систем, компоненты которых наиболее адаптированы друг к другу и сохраняют способность к эффективному взаимодействию в широком диапазоне экофакторов [4]. Именно почвенные микроорганизмы выполняют системообразующие функции в процессах почвообразования, разложения почвенного органического вещества, стимуляции роста и обеспечении защиты растений от патогенной микрофлоры.

При этом возможностью и необходимостью усовершенствования экологического подхода к оценке состояния почвенной биоты является характеристика таксономического и функционального разнообразия микроорганизмов. Чем больше разнообразие, тем выше устойчивость системы. Качественный состав микроорганизмов дает возможность оценить фитосанитарное состояние почвы и выявить причины почвоутомления [5].

В последние годы почвенные биологи активно осваивают современные ускоренные методы исследования почвенной биоты и почвенных процессов, так как классические микробиологические методы – культуральные и микроскопии, имеют ряд существенных недостатков [6].

Количественный учет представителей основных таксономических групп микробного сообщества почв (сапротрофных бактерий, актиномицетов, микромицетов) было принято осуществлять методом поверхностного посева из разведений на плотные селективные питательные среды. Метод, не являясь универсальным, требует больших временных и трудовых затрат. А также подавляющее большинство бактерий и архей в почвах являются некультивируемыми формами микроорганизмов [7].

Основным методом прямого определения микробной биомассы считается подсчет численности грибного и бактериального компонентов микробного сообщества с использованием люминесцентной микроскопии. К недостаткам этого метода можно отнести трудности при сравнении результатов, получаемых разными исследователями, ненадежность дифференциации клеток на живые и мертвые, условности выбора коэффициентов пересчета числа клеток на биомассу [8].

Для оценки уровня микробиологического разложения органического вещества исследуется активность ряда ферментов, которая в значительной степени является результатом химической деятельности микробной биоты (протеаза, уреаза, целлюлаза, инвертаза, каталаза, дегидрогеназа). Ферментативная активность почв в природных условиях ограничивается малым количеством доступного субстрата в результате слабой растворимости почвенного органического вещества [9].

Появление молекулярно-биологических методов, базирующихся на выделении тотальной микробной ДНК из почвы и последующем ее анализе, стало новым этапом в развитии почвенной микробиологии, предоставив прямой доступ к колоссальному генетическому разнообразию «некультивируемого большинства» микроорганизмов в почве [10].

В десяти граммах почвы может находиться до 10^6 видов бактерий и архей [11]. После выделения ДНК микроорганизмов из почвенного образца проводится амплификация фрагментов полученного генетического материала с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующим образом подобранными праймерами и условиями реакции, поскольку извлеченного материала, как правило, недостаточно для непосредственной идентификации. Продукты амплификации далее используются для анализа либо путем прямого секвенирования, либо с помощью электрофореза в градиенте денатурирующего агента (DGGE), или для гибридизации *in situ* – метод FISH (fluorescent *in situ* hybridization) и его модификации, осуществляемые с помощью эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии или масс-спектрометрии [12].

Одним из наиболее доступных подходов является использование величины общего количества (концентрации ДНК) в качестве индекса общей микробной биомассы при по-

мощи коммерческих готовых наборов («kits»), либо с реактивами и одноразовой пластиковой посудой. Микробная биомасса – важный, живой, лабильный компонент и природный микробный потенциал почвы [13].

Основные этапы выделения ДНК из почвы – это разрушение почвенных агрегатов и клеточных стенок; очистка экстракта; десорбция ДНК с матрикса, перевод ДНК в водный раствор и определение концентрации ДНК в экстракте. Апробация и модификация данных этапов способствовала переходу от определения общей биомассы к определению таксономической структуры микробного сообщества [14].

Часто продукты амплификации используют для анализа путём прямого секвенирования. Обычно проводят секвенирование: по маркерным генам (16S рРНК для прокариот, ITS регион для грибов и др.); по различным целевым генам (устойчивости, патогенности и др.); полного генома микроорганизма [15].

При оценке почвенного сообщества с помощью метагенетического подхода происходит экстракция и анализ суммарной ДНК, которая включает генетический материал микроорганизмов, находящихся во всех физиологических состояниях: активном, потенциально активном, покоящемся и мертвом. Кроме того, в состав суммарной ДНК может также входить внеклеточная ДНК. Двумя главными способами изучения почвенной ДНК микроорганизмов стали анализ ампликонов и метагеномный подход [16].

Термин «метагеномика» был предложен в 1998 г. Handelsman с соавторами [17].

Развитие технологий секвенирования за последнее десятилетие значительно расширило глубину полногеномного секвенирования методом *shotgun sequencing*, позволяющего изучать непосредственно метагеном – совокупный геном какого-либо сообщества организмов в образце, а не конкретный маркерный ген. При секвенировании методом *shotgun sequencing* геномы разрезаются случайным образом на фрагменты, которые затем секвенируются и собираются в контиги – наборы длинных перекрывающихся фрагментов ДНК [18].

В нашей стране метагеномные исследования почв еще достаточно мало распространены. Получающийся в результате почвенный метагеном является ее функциональным профилем, составленным из генетической информации на основании реконструкции преимущественных метаболических путей [19].

Подавляющее большинство архей и бактерий в почвах представляют собой некультивируемые формы микроорганизмов, родовой, видовой состав и относительная численность которых могут быть определены с помощью метода высокопроизводительного секвенирования последовательностей гена 16S рРНК из образцов тотальной почвенной ДНК. Результатом такой идентификации может быть список таксонов с их относительной представленностью в составе сообщества и их корреляция с почвенно-экологическими условиями, ограниченной специфичностью используемых для простейших праймеров [20]. Возможное решение проблемы выявления связи между филогенетическими группами и их функциями в почве – в применении количественного сравнительного экспресс-анализа рРНК генов и генов ключевых ферментов.

Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК используют универсальные праймеры к его варибельному участку V4:F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) [21].

При проведении количественной ПЦР (qPCR) для выявления в почве трех основных таксономических групп микроорганизмов зачастую применяют следующие пары праймеров: к фрагменту 16S рДНК бактерий – EUB338 (5-АСТ-ССТАСГГГАСГСАС-3) и EUB518 (5-АТТАСГГГСТГТГГ-3), к фрагменту 16S рДНК архей – ARC915f (5-АГГААТТГГСГГГГАСАС-3) и ARC1059r (5-ГССАТГСАССВСТТ-3), к фрагменту ITS грибов – ITS1f (5-ТССГТАГГТГААССТГСГГ-3) и 5.8S (5-СГСТГСГТТСТТАТСГ-3). Стандартами служат серии 10-кратных разведений фрагментов гена 16S рРНК *E. coli* и *H. pylori*, а также фрагмента ITS1 *S. cerevisiae* [22].

В связи с трудностями анализа почвенной ДНК, такими как выделение живых и метаболически активных организмов из общего пула, высокая стоимость и др., метагеномику и метагеноетику дополняют методами РНК-метабаркодинга и метатранскриптомики (RNA-seq), с помощью которых происходит анализ только живых организмов [23]. Возможное решение проблемы выявления связи между филогенетическими группами и их функциями в почве – в применении количественного сравнительного экспресс-анализа рРНК генов и генов ключевых ферментов [24].

Существует тесная взаимосвязь между структурой прокариотного сообщества и почвенно-климатическими факторами. Изучение микробного разнообразия делает возможным оценить «здоровье почвы». Для этого необходимо разработать комплексный подход на основе «индикаторных показателей», с помощью которых можно прогнозировать, управлять и поддерживать продуктивность агроценозов. В связи с этим одной из приоритетных задач исследований является поиск микроорганизмов-индикаторов качества почв. При этом для каждого типа почв характерен специфический микробиом, в связи с чем в исследованиях необходимо учитывать не только возделываемую культуру, но и район исследования и морфогенетическую принадлежность почв [25].

Выводы. Для разработки комплексного подхода к оценке «здоровья почвы» целесообразно совмещать микробиологические и молекулярно-генетические методы исследований, а также сравнительное изучение уровня ферментативной активности почв. Полученные данные помогут выделить микроорганизмы-индикаторы и разработать методы биологизированной системы воспроизводства почвенного плодородия.

Для проведения исследований в этом направлении в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» реализованы первые этапы работы:

1. Сформирована лаборатория микробиологии почв с необходимой приборной базой и реактивами: микроскоп биологический «Микромед»; автоклав паровой VK-18; шкаф сушильный ШС-20-02 СПУ мод.2002 (20 л); центрифуга для пробирок Эппендорф; весы и др.

2. Начаты исследования структуры почвенного микробиома черноземов выщелоченных в садовых агроценозах Прикубанской зоны садоводства Краснодарского края:

- проводится адаптация методов определения ферментативной активности для исследования садовых почв;

- ведутся работы по апробации методов экстракции тотальной ДНК из почвенных образцов.

Планируется интеграция и усовершенствование молекулярно-генетических методов оценки почвенного микробного разнообразия в творческом содружестве с селекционно-биотехнологической лабораторией и специалистами других организаций, что позволит определить количественные и качественные характеристики прокариотного сообщества почв садовых агроценозов и выявить функциональную составляющую микробиома для оценки здоровья и плодородия почв.

Литература

1. Соколов М.С., Марченко А.И. Здоровая почва как основа благополучия России (концептуально-аналитические аспекты) // Агрехимия. 2011. № 6. С. 3-10.

2. Анализ показателей почвенного микробиома в процессах, связанных с почвообразованием, трансформацией органического вещества и тонкой регуляции вегетационных процессов / Е.Е. Андронов [и др.] // Бюллетень Почвенного института им. В.В. Докучаева. 2015. Вып. 80. 83 с.

3. Попова В.П., Коростелева В.А. Особенности формирования почвенно-биотического комплекса в многолетних плодовых насаждениях // Наука Кубани. 2007. С. 93-97.

4. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроэкологии будущего. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2009. 210 с.
5. Степанова Л.П., Яковлева Е.В., Писарева А.В. Экологическая оценка характера антропогенного воздействия на изменение структуры микробиологического комплекса техногенно трансформированных земель // Плодородие. 2016. №3. С. 37-40.
6. Lorenz P., Liebeton K., Niehaus F., Eck J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space // *Current Opinion in Biotechnology*. 2020. Vol. 13, Issue 6. P. 572-577.
7. Методы почвенной микробиологии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
8. Сравнительная оценка микробной биомассы почв, определяемой методами прямого микроскопирования и субстрат-индуцированного дыхания / Н.Д. Ананьева [и др.] // *Микробиология*. 2008. Том 77. № 3. С. 404-412.
9. Tareno M. Limitations of available substrates for the expression of cellulose and protease activities in soil // *Soil Biol. Biochem.* 1988. Vol. 20, N. 1. P. 117–118.
10. Семенов М.В. Метакарбодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // *Журнал общей биологии*. 2019. Том 80, № 6. С. 403-417.
11. Prosser J.I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of ‘omics’ in soil microbial ecology // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 13. № 7. P. 439-446.
12. Baldrian P., Kolarik M., Stursova M., Kopeccky J., Valaskova V., Vetrovsky T., Zifcakova L., Snajdr J., Ridl J., Vlcek C., Voriskova J. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition // *ISME J.* Vol. 6. № 2. P. 248-258.
13. Евдокимов И.В. Методы определения биомассы почвенных микроорганизмов // *Russian journal of ecosystem ecology*. 2018. Vol. 3 (3). P. 1-20.
14. Nielsen K.M., Calamai L., Pietramellara G. Stabilization of extracellular DNA and proteins by transient binding to various soil components // *Soil Biology*. 2006. Vol. 8. P. 141-157.
15. Равин Н.В., Марданов А.В., Скрыбин К.Г. Метагеномика как инструмент изучения «некультивируемых» микроорганизмов // *Генетика*. 2015. Т. 51, №5. С. 519-528.
16. Nesme J., Achouak W., Agathos S.N., Bailey M., Baldrian P. et al. Back to the future of soil metagenomics // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 73.
17. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products // *Chem. Biol.* 1998. Vol. 5. N. 10. P. 245-249.
18. Семенов М.В. Метакарбодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // *Журнал общей биологии*. 2019. Т. 80, № 6. С. 403-417.
19. Geisen S., Laros I., Vizcaino A., Bonkowski M., de Groot G.A. Not all are free-living: High-throughput DNA metabarcoding reveals a diverse community of protists parasitizing soil metazoan // *Mol. Ecol.* 2015. Vol. 24. N. 17. P. 4556-4569.
20. Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C., Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding // *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21. N. 8. P. 2045-2050.
21. Bates S.T., 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.* 2010. N. 5. P. 908-917.
22. Микробиомы природных и антропогенно-трансформированных почв Надымского района ЯНАО / Е.В. Абакумов [и др.] // *Отражение био-, гео-, антропоферных взаимодействий в почвах и почвенном покрове: сборник материалов VII Международной научной конференции, посвященной 90-летию кафедры почвоведения и экологии почв ТГУ (14-19 сентября 2020 г., Томск)*. Томск: ТГУ, 2020. С. 190-192.
23. Bouchez T., Bliex A.L., Dequiedt S., Domaizon I., Dufresne A. et al., Molecular microbiology methods for environmental diagnosis // *Environ. Chem. Lett.* 2016. Vol. 14. N. 4. P. 423-441.
24. Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Панкратов Т.А., Лысак Л.В., Звягинцев Д.Г. Оценка бактериального разнообразия почв: эволюция подходов и методов // *Почвоведение*. 2009. № 10. С. 1222-1232.
25. Круглов Ю.В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие методы исследования (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Том 51. №1. С. 46-59.