

УДК 579.64:631.46(574.1)

Нагиева А.Г., доктор PhD., и.о. доцента

Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана, г. Уральск

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ТЕМНО-КАШТАНОВОЙ ПОЧВЫ ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ И ИХ ОЦЕНКА

Аннотация

В статье приведены результаты исследований структура почвенного микробиома и их содержание в темно-каштановых почвах Западно-Казахстанской области. Почва для микроорганизмов является сложной системой и на состав бактериальных сообществ сухостепных почв влияют такие факторы, как содержание органического вещества, pH, влажность, доступность питательных веществ, температура и другие. Для молекулярно-генетического анализа микробных сообществ почв важным шагом стало появление молекулярного метода высокопроизводительного секвенирования, т.е. исследование и сравнение последовательностей ДНК библиотек таксономически значимых генов (16S рРНК), геномов отдельных организмов или совокупности геномов организмов в образце. Количественную оценку ДНК бактерий и архей почвенных образцов проводили, используя ПЦР в реальном времени (real-time PCR). Для бактерий контрольным вариантом использовали клонирование фрагмента рибосомного оперона *Escherichia coli* (Sigma), для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*. В результате проведенных исследований (таблица 1) в профиле почв выделенное микробное сообщество состоит из доминирующих представителей фил 9 бактерий *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* и *Firmicutes*, другие присутствующие в почве бактерии занимают малые доли в общем количестве. Отмечается неравномерное распределение на пастбищном участке, где численность актинобактерий с 55,0% с поверхностного горизонта идет на увеличение в горизонте В₂ до 64,0% и снижением содержания в нижнем С горизонте до 12,0%, параллельно идет увеличение с глубиной филума *Proteobacteria* с 12,7% до 78,8%. Пастбищный участок темно-каштановой почвы характеризовался повышенной щелочностью, верхние горизонты отличались от нижележащих незасоленностью. Главными факторами, влияющими на микробное сообщество, являются вид землепользования, содержание гумуса, засоленность и глубина залегания горизонтов. В почвенной структуре главное звено микробного сообщества имеет определяющее значение – главными компонентами, влияющими на функционирование почвенных свойств, являются численность микроорганизмов. Такие результаты дают сравнение таксономического состава почвенных микроорганизмов различных типов почв с различным сельскохозяйственным использованием и дают возможность оценить их на количественной основе, планировать перспективные мероприятия и намечать необходимые меры по плодородию почв.

Ключевые слова: почвенный микробиом, пастбище, секвенирование, таксономия, почва.

К изменениям гумусного состояния почв, а именно к снижению содержания и запасов гумуса, качества и процессы дегумификации, привели сельскохозяйственное освоение земель, распашка целинных почв, смена ценозов агроценозами. Обработка почвы играет значимую роль в балансе гумуса: чем больше почву обрабатывают, тем больше происходит минерализация гумуса, такая закономерность объясняется наиболее быстрым разложением

органического вещества в аэробных процессах. При минимальных обработках почвы снижается минерализацию гумуса [1].

Развитие новых технологий в экологической микробиологии позволило более глубоко подойти к оценке микробной биоразнообразия почв. Почва для микроорганизмов является сложной системой и на состав бактериальных сообществ сухостепных почв влияют такие факторы, как содержание органического вещества, рН, влажность, доступность питательных веществ, температура и другие [2].

В почве микроорганизмы принимают участие в круговороте фосфора, разрушают органическое вещество корней и переводят фосфор в минеральную форму [3]. При высокой температуре усиливается микробиологическая деятельность микроорганизмов, тем самым приводит к увеличению активности фосфорной кислоты [4, 5].

Для молекулярно-генетического анализа микробных сообществ почв важным шагом стало появление молекулярного метода высокопроизводительного секвенирования, т.е. исследование и сравнение последовательностей ДНК библиотек таксономически значимых генов (16S рРНК), геномов отдельных организмов или совокупности геномов организмов в образце [6,7]. Анализ ДНК рассматривает исследование таксономической и функциональной структуры микробного сообщества, которые позволяют выявить и описать новые филогенетические группы прокариот, для многих из которых до настоящего времени не получено культивируемых представителей. Производительность современных секвенаторов возрастает с каждым годом и уже приближается к решению проблемы полного секвенирования почвенного метабенома [8].

Исследования проводили на темно-каштановой почве пастбищного угодья. Пробы почвенных образцов для проведения последующего химического анализа отбирали из средней части каждого горизонта почвенного профиля в хлопчатобумажные мешочки и высушивали до воздушно-сухого состояния.

Для молекулярно-генетического анализа образцы массой 5-10 г отбирали в трехкратной повторности и до выделения ДНК хранили в герметично закрытых контейнерах при температуре -70°C .

Количественную оценку ДНК бактерий и архей почвенных образцов проводили, используя ПЦР в реальном времени (real-time PCR). Для бактерий контрольным вариантом использовали клонирование фрагмента рибосомного оперона *Escherichia coli* (Sigma), для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*.

Пастбищный участок темно-каштановой почвы характеризовался повышенной щелочностью, верхние горизонты отличались незасоленностью. Преобладание кальция и хлоридов отмечено в горизонтах В₂, ВС, С, а также кроме бикарбонатов и хлоридов в горизонте С преобладание сульфатов до 0,350%. Сумма солей - 1,041%, рН 8,2-8,7 (таблица 1).

В результате проведенных исследований (таблица 1) в профиле почв выделенное микробное сообщество состоит из доминирующих представителей фил 9 бактерий *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* и *Firmicutes*, другие присутствующие в почве бактерии занимают малые доли в общем количестве [9, 10]. Отмечается неравномерное распределение на пастбищном участке, где численность актинобактерий с 55,0% с поверхностного горизонта идет на увеличение в горизонте В₂ до 64,0% и снижением содержания в нижнем С горизонте до 12,0%, параллельно идет увеличение с глубиной филума *Proteobacteria* с 12,7% до 78,8%.

Для сравнительной оценки полученных результатов микробных сообществ в исследуемых почвах нами была построена диаграмма Венна, представляющие собой схематичное изображение в виде пересечений трех кругов. Диаграмму применяли для расчета рациональных комбинаций сравнения между типами почв, видами землепользования и генетическими горизонтами. На диаграммах Венна с помощью перекрывающихся кругов продемонстрированы сходства, различия и связи между исследуемыми образцами. Сходство между группами, представлено перекрывающимися частями кругов,

а различия – неперекрывающимся. Приведена сравнительная оценка темно-каштановой почвы по генетическим горизонтам (рисунок 1).

Таблица 1 – Химические и микробиологические показатели генетических горизонтов темно-каштановой почвы

Показатели		Темно-каштановая, пастбище				
		A ₁	B ₁	B ₂	BC	C
1		2	3	4	5	6
Химический анализ	pH	8,2	8,56	8,6	8,71	8,24
	Гумус, %	2,6	2,2	0,8	-	-
	Сумма солей, %	0,097	0,118	0,247	0,327	1,041
Разнообразие микроорганизмов 1	Количество сиквенсов	1943	3780	2877	2404	7492
	Число ОТЕ	442	437	403	332	199
	2	3	4	5	6	7
	Индекс Chaol	1165	1501	1318	826	604
	Индекс Шеннона	7,7	7,6	7,4	6,9	4,1
Состав бактериальных сообществ, %	<i>Other</i>	0,9	0,9	0,8	1,2	0,3
	<i>Crenarchaeota</i>	7,5	13,9	9,3	8,0	1,3
	<i>Acidobacteria</i>	4,9	4,9	2,4	2,0	0,9
	<i>Actinobacteria</i>	55,7	55,0	64,9	50,2	12,0
	<i>Armatimonadetes</i>	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
	<i>Bacteroidetes</i>	1,2	0,8	1,2	2,0	1,7
	<i>Chlamydiae</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Chlorobi</i>	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
	<i>Chloroflexi</i>	6,8	6,6	5,5	6,4	1,1
	<i>Cyanobacteria</i>	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3
	<i>Elusimicrobia</i>	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
	<i>FBP</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Firmicutes</i>	1,5	1,7	1,1	1,5	1,5
	<i>Gemmatimonadetes</i>	4,9	4,4	3,4	2,5	0,9
	<i>Nitrospirae</i>	0,1	0,2	0,6	0,1	0,1
	<i>Planctomycetes</i>	2,2	1,5	1,7	2,1	0,7
	<i>Proteobacteria</i>	12,7	8,8	7,9	22,6	78,8
	<i>Verrucomicrobia</i>	1,0	0,8	0,8	0,9	0,4
[<i>Thermi</i>]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

По данным рисунка 1 сравнение горизонтов темно-каштановой почвы для каждого землепользования в верхнем А горизонте показал, что доля сиквенсов и по количеству ОТЕ превышает в пахотном участке - образец Ap_pash с долей сиквенсов 10,50% или 304 ОТЕ; в попарном пресечении преобладают пресечение пастбища с пашней (7,69% SEQ или 66 ОТЕ). В горизонте В1 общая схожесть составила 62,28% сиквенсов или 85 ОТЕ, который несколько превышает другие горизонты; в попарном пресечении и единичном кластере резких отличий не наблюдалось. Образец В2_ТК_past отличаюсь повышенным количеством ОТЕ по сравнению с другими образцами, по количеству сиквенсов не превышал В2_pash; более схожим по содержанию бактерий оказались целина и пастбище (5,89% SeQ или 50 ОТЕ).

Итак, полученные результаты показали, что анализ метода главных компонент позволил проанализировать значительный массив представленных данных и выявить главные компоненты, которые играют важную роль в исследованных почвенных участках. Результаты показали успешность применения этого метода для анализа большой выборки полученных

данных с разными размерностями и установили его перспективность в обработке подобных массивов и наглядной оценке состояния почв. Главными факторами, влияющими на микробное сообщество, являются вид землепользования, содержание гумуса, засоленность и глубина залегания горизонтов. В почвенной структуре главное звено микробного сообщества имеет определяющее значение – главными компонентами, влияющими на функционирование почвенных свойств, являются численность микроорганизмов.

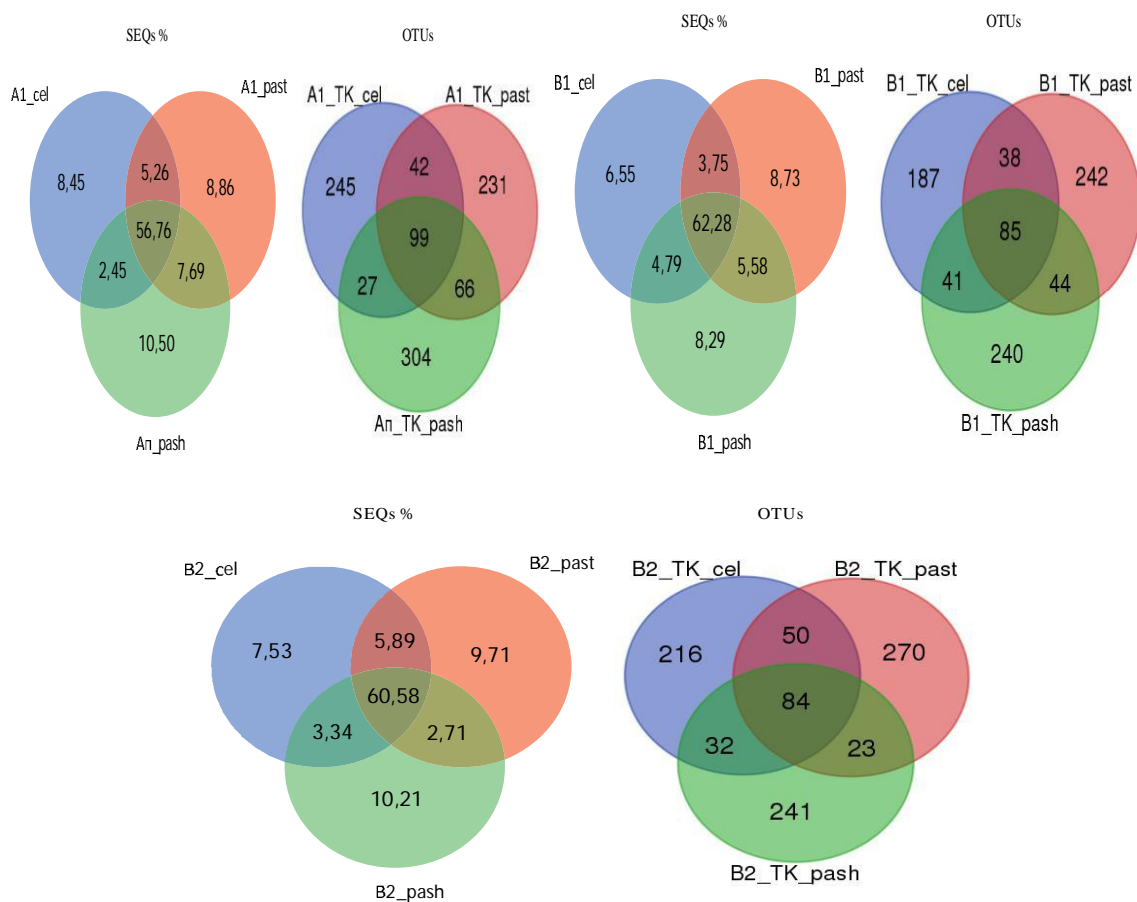


Рисунок 1 - Сравнительная оценка набора кластеров в образцах темно-каштановых почв различных угодий

Таким образом, анализируя данные, можно констатировать, что плодородие почвы в огромной степени определяется агрохимическими свойствами, основными из которых считаются состав гумусовых веществ, показатели рН, содержание подвижных форм азота, фосфора и калий. Для эффективного повышения и поддержания плодородия почвы необходим постоянный мониторинг плодородия сельскохозяйственных земель и оптимизация почвенных свойств. Однако, антропогенное воздействие на почву масштабно и продолжает возрастать, тем самым идет расширение пустынных площадей за счет сокращения площади степей, лесов и т.д. Комплексная оценка всех критериев биоразнообразия почвенных микроорганизмов позволяют оценить степень устойчивости изучаемых объектов, уровень антропогенного воздействия на ее структуру и т.д. Для сохранения плодородия почв необходим постоянный мониторинг плодородия сельскохозяйственных земель и оптимизация на этой базе почвенных свойств и режимов. В связи с этим в настоящее время применение современных методов высокопроизводительного секвенирования с совмещением традиционных методов почвоведения позволит более информативно изучить профильное распределение почвенных микроорганизмов. Такие результаты дают сравнение таксономического состава почвенных микроорганизмов различных типов почв с различным сельскохозяйственным использованием и

дают возможность оценить их на количественной основе, планировать перспективные мероприятия и намечать необходимые меры по плодородию почв.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов Г.Д. Влияние обработки почв на изменение агрохимических показателей // Тез. докл. на юбилейной конференции ТатНИИСХ. - Казань, 1980. - С.14-15.
2. Daniel, R. The metagenomics of soil. // Nature Reviews Microbiology - 2005. – Vol. 3. – P. 470-478.
3. Соколов А.В. Агрохимия фосфора. - М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950. – 150 с.
4. Коршунов М.А. Изменение плодородия серых лесных почв Татарии под воздействием сельскохозяйственных культур и удобрений. – Казань : Изд. казанского универ., 1972. - 108 с.
5. Нуриев С.Ш., Гадиев К.Г. Влияние удобрений на фосфатный режим светло-серых лесных почв Татарии // Тез. докл. Республиканской научно-практической конференции по вопросам химизации сельского хозяйства. - Казань, 1978. - С.41-43.
6. Quail M. A., Smith M., Coupland P., Otto T. D., Harris S. R., Connor T. R., Bertoni A., Swerdlow H. P., Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – 341.
7. Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S. M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J. A., Smith G., Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // The ISME Journal. – 2012. – Vol. 6. – P. 1621–1624.
8. Delmont T.O, Robe P., Cecillon S., Clark I.M., Constancias F., Simonet P., Hirsch P.R., Vogel T.M. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity // Applied and environmental microbiology. - 2011. - Vol. 77, № 4. - P. 1315-1324.
9. Нагиева А.Г. Оценка микробного биоразнообразия темно-каштановых почв Западно-Казахстанской области. / 3i: intellect, idea, innovation - интеллект, идея, инновация. №2. Костанай: КГУ им. А. Байтурсынова, 2017. с.192-199
10. Сергалиев Н.Х., Андронов Е.Е. Нагиева А.Г. Изучение микроорганизмов почв Западного Казахстана методом метагеномного секвенирования. Исследования, результаты. КазНАУ. № 3 (75). - Алматы 2017. с. 309-315.

ТҮЙІН

Мақалада Батыс Қазақстан облысының қара каштан топырақтарындағы топырақ микробиомының құрылымын және олардың құрамын зерттеу нәтижелері келтірілген. Зерттеулер нәтижесінде (1-кесте) топырақ профиліндегі оқшауланған микробтық қауымдастық фила 9 бактерияларының басым өкілдерінен тұрады Протеобактериялар, Ацидобактериялар, Актинобактериялар, Веррукомикробия, Бактериоидтер, Хлорофлекси, Планктомицет, Гемматимонадет және Фирмикуттар, олардың құрамындағы басқа бактериялардың мөлшері . Топырақ құрылымында микробтық қауымдастықтың негізгі буыны шешуші маңызға ие - топырақ қасиеттерінің жұмысына әсер ететін негізгі компоненттер микроорганизмдердің саны болып табылады. Бұл нәтижелер әр түрлі типтегі топырақтардағы топырақ микроорганизмдерінің таксономиялық құрамын ауылшаруашылығы мақсатымен салыстыруды қамтамасыз етеді және оларды сандық негізде бағалауға, перспективалы шараларды жоспарлауға және топырақтың құнарлылығы үшін қажетті шараларды белгілеуге мүмкіндік береді.

RESUME

The article presents the results of studies of the structure of soil microbiome and their content in the dark chestnut soils of the West Kazakhstan region. As a result of the studies (Table 1), the isolated microbial community in the soil profile consists of the dominant representatives of phyla

9 bacteria Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Gemmatimonadetes and Firmicutes, other bacteria present in the soil occupy small proportions in the total amount ... In the soil structure, the main link of the microbial community is of decisive importance - the main components influencing the functioning of soil properties are the number of microorganisms. These results provide a comparison of the taxonomic composition of soil microorganisms of different types of soils with different agricultural uses and make it possible to evaluate them on a quantitative basis, plan promising measures and outline the necessary measures for soil fertility.

МРНТИ 87.51.00

Нагиева А. Г.¹, доктор PhD., и.о. доцента

Сергалиев Н. Х.², кандидат биологических наук, ассоциированный профессор

¹Западно-Казахстанский аграрно-технический университет им. Жангир хана, г. Уральск

²Западно-Казахстанский Государственный университет им. М.Утемисова, г. Уральск,

ЭМИССИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА ИЗ СУХОСТЕПНОЙ ПОЧВЫ ЗАПАДНОГО КАЗАХСТАНА

Аннотация

Актуальность нашего исследования имеет большую научную значимость и связана с усилением антропогенного воздействия, которое в настоящее время недооценено. Особый интерес представляют сельскохозяйственные экосистемы. Динамика почвенного дыхания зависит от типа экосистемы и зоны, определяющие биологическую активность и термодинамические условия пояса протекания процесса оценкой потоков углерода в почвах сухостепной зоны в условиях резкоконтинентального климата.

Результаты наших исследований показали зависимость эмиссии CO₂ из почвы от типа экосистемы и климатических условий. Так, при критичной температуре и дефиците осадков в летний сезон эмиссия диоксида углерода увеличивалась, сравнительно с наблюдаемыми сезонами.

В ходе исследования проведены измерения сезонной и годовой динамики потоков CO₂ из темно-каштановых почв различных экосистем. Базируясь на еженедельных измерениях рассчитаны среднемесячные, среднесезонные и среднегодовые потоки CO₂ изучаемых почв. Для всех исследуемых экосистем был характерен «классический» для резкоконтинентальной зоны характер изменения месячных потоков CO₂ из почв: с минимальными величинами - в позднесенний и зимний периоды, и с максимальными – поздневесенние и летние месяцы, когда складываются наиболее благоприятные (в среднем) погодные условия для функционирования микробных сообществ и имеет место активный дыхательный процесс корневых систем высших растений. Эмиссия CO₂ не прекращается в зимнее время года даже в примерзшей почве, что является стабильным показателем, характеризующим особенности эмиссии CO₂ из почв. Последующее оттаивание почв инициирует значительный по величине всплеск эмиссии CO₂ в весенний период. Непрерывный мониторинг за эмиссией CO₂ показал результаты ежемесячных, сезонных и годовых потоков CO₂ из темно-каштановой почвы. Влияние типа землепользования сказывалось как на ежемесячных, сезонных и годовых величинах эмиссии CO₂ из почв, так и между отдельными сезонами года, где одним из основных причин обнаруженных различий в эмиссионной чувствительности почв летних периодов по годам заключается в дефиците осадков в текущем году, также в указанном ряду почв убывает количество тонких корней, которые дают более заметный отклик на повышение температуры по сравнению с массой почвы без корней.

Ключевые слова: почва, эмиссия, углекислый газ, поток, влажность, температура почвы.