

4. State of the Environment in the Republic of Moldova: Republic of Moldova (National Report – Synthesis). – Ch. : "Nova Imprim" SRL, 2011. 2007-2010. – 2011. – 88 p.

CZU: 631.46:631.445.4:631.86

DOI: 10.46727/c.v1.18-19-03-2023.p243-249

**СТРУКТУРА И РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТНОГО СООБЩЕСТВА
КАРБОНАТНОГО ЧЕРНОЗЕМА В ДЛИТЕЛЬНОМ ПОЛЕВОМ ОПЫТЕ С
ОРГАНИЧЕСКИМИ УДОБРЕНИЯМИ**

**THE STRUCTURE AND DIVERSITY OF THE PROKARYOTIC COMMUNITY OF
CARBONATE CHERNOZEM IN LONG-TERM FIELD EXPERIMENT WITH
ORGANIC FERTILIZERS**

Диана Индоиту, Технический Университет Молдовы

Diana Indoitu, Technical University of Moldova
ORCID: 0000-0003-4190-7816, diana.indoitu@imb.utm.md

Rezumat. *Analiza influenței utilizării pe termen lung a îngrășămintelor organice (efectul direct al gunoiiului de grajd) asupra structurii taxonomice și diversității comunităților procariote din cernoziomul carbonat din Moldova a fost realizată pentru prima dată cu utilizarea secvențierii de generație următoare. A fost studiat stratul superior al solului (0-20 cm) în rotația culturilor din câmp. În variantele cu fertilizare organică au fost depistate 15 filumuri: 2 filumuri arheale și 13 filumuri bacteriene; în varianta martor fără utilizarea îngrășămintelor – doar 13 filumuri: 2 filumuri arheale și 11 filumuri bacteriene. Cea mai mare parte a comunității procariote din sol este formată din următoarele filumuri bacteriene: Actinobacteriota, Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Myxococcota, Nitrospirota, Gemmatimonadota; au dominat Actinobacteriota, Proteobacteria și Firmicutes; în rândul arheilor a dominat filumul Nitrososphaerota (Thaumarchaeota). Filumurile mai puțin reprezentate au fost: Cyanobacteria, Fibrobacterota, Halobacterota (Archaea), Chloroflexi. Cyanobacteria și Fibrobacterota au fost identificate doar în variantele cu gunoi de grajd (în stratul 0-20 cm). Ponderea filumurilor dominante, cu excepția Firmicutes, a crescut semnificativ în varianta cu gunoi de grajd. Diversitatea comunităților procariote a fost evaluată cu ajutorul unor indici ecologici: Simpson, Shannon, Pielou, Margalef, Menhinick, Williams. În varianta cu gunoi de grajd, toți indici ecologici studiați indică o diversitate mai mare.*

Cuvinte-cheie: *secvențiere de generație următoare, microbiomul solului, gunoi de grajd, bacterii, archaea, indice de diversitate.*

Abstract. *The analysis of the influence of long-term use of organic fertilizers (direct effect of manure) on the taxonomic structure and diversity of prokaryotic communities in the chernozem carbonate of Moldova was carried out for the first time using next-generation sequencing. The topsoil (0-20 cm) in field crop rotation was studied. In the variants with organic fertilization, 15 phyla were detected: 2 archaeal phyla and 13 bacterial phyla; in the variant without the use of fertilizers – only 13 phyla: 2 archaeal phyla and 11 bacterial phyla. Most of the prokaryotic community in the soil consists of the following bacterial phyla: Actinobacteriota, Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Myxococcota, Nitrospirota, Gemmatimonadota; Actinobacteriota, Proteobacteria and Firmicutes dominated; among the Archaea, the phylum Nitrososphaerota (Thaumarchaeota) dominated. The less represented phyla were: Cyanobacteria, Fibrobacterota, Halobacterota (Archaea), Chloroflexi. Cyanobacteria and Fibrobacterota were identified only in the variants with manure (in the soil layer 0-20 cm). The share of dominant phyla, with the exception of Firmicutes, increased significantly in the variant with manure. The diversity of prokaryotic communities was assessed using ecological indices: Simpson, Shannon, Pielou, Margalef, Menhinick, Williams. In the variant with manure, all ecological indices studied indicate a greater diversity.*

Keywords: *next-generation sequencing, soil microbiome, manure, bacteria, archaea, diversity index.*

Введение

Почвенная биота играет ключевую роль в экосистемах, по составу и богатству почвенной микробиоты можно предсказать множество функций экосистемы, например, разнообразие и

продуктивность растений, круговорот питательных веществ [2, с.506; 7, с.2; 12, с.2; 8, с.210; 16, с.5266]. Сокращение биоразнообразия со временем дестабилизирует функционирование экосистем, в случае утраты биоразнообразия функционирование экосистем может даже стать невозможным [10, с.337; 11, с.188; 5, с.59]. Состав почвенных бактериальных сообществ изменяется под действием различного управления земельными ресурсами, например, как севооборот, обработка почвы, внесение удобрений [13, с.1; 6, с.12; 3, с.2297; 15, с.976]. Сохранение и увеличение разнообразия почвенных микробных сообществ важно для экосистем, в которых они задействованы, для продовольственной безопасности населения [17, с.2; 4, с.233].

Структура и разнообразие не всех почв достаточно изучены на данный момент, так как по некоторым данным до 99 % почвенных микроорганизмов являются некультивируемыми, а это значит, что они не могут быть идентифицированы методами культивирования на питательных средах [1, с.143]. Оценить структуру микробного сообщества *in situ* стало возможным только с помощью современных метагеномных технологий [9, с.4117].

Цель данного исследования - оценить с помощью секвенирования нового поколения (NGS) влияние длительного выращивания сельскохозяйственных культур в полевом севообороте с применением органических удобрений на таксономическую структуру и разнообразие прокариот карбонатного чернозема. В условиях Молдовы такие исследования проводятся впервые.

Результаты и обсуждение

В данной работе были изучены такие биологические параметры почвы, как структура и биоразнообразие прокариотного микробного сообщества. Исследования проводились с применением технологии высокопроизводительного секвенирования, т.е. «считывания» нуклеотидных последовательностей в нуклеиновой кислоте. Биоразнообразие карбонатного чернозёма Молдовы было изучено впервые с использованием метагеномного анализа. Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Эффективное использование почвенных ресурсов и микробного разнообразия за счет применения элементов биологического (органического) земледелия» № 20.80009.5107.08.

Исследования проводились в длительном стационарном полевом опыте, заложенном в 1950 году на экспериментальной станции Кетросы в Центральной зоне Молдовы (с. Кетросу, Новые Анены). Почва – карбонатный чернозём или Calcic chernozem в World reference base for soil resources: легкий суглинок с 2,5-3,0% гумуса, 0,8-1,5 мг/100 г подвижного фосфата (по Мачигину), 18-22 мг/100 г обменного калия и 1,8-2,2% карбонатов в слое 0-20 см. Севооборот восьмипольный: кукуруза на зерно – горох – озимая пшеница – озимая пшеница – кукуруза на зерно – горох – озимая пшеница – подсолнечник. Изучались следующие варианты полевого севооборота: 1. без внесения удобрений с 1950 г., 2. длительное внесение органических удобрений – прямое действие полуперепревшего навоза (более 25 лет). Доза навоза составляла всего на севооборот 144 т/га, это включало по 40 т под каждую кукурузу на зерно, 22 т под озимую пшеницу перед кукурузой и перед подсолнечником, 20 т под подсолнечник. Пробы почвы отбирались весной из слоя 0–20 см, повторность трёхкратная. Срок отбора проб почвы был одинаковым для всех исследованных вариантов.

Метагеномный анализ проводился с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Секвенирование генов

16S рРНК проводили на генетическом анализаторе MiSeq от Illumina (США). Таксономическая идентификация ОТЕ была выполнена с помощью базы данных RDP (SILVA), классификация уточнена с помощью онлайн базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) и базы данных The List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN, <https://lpsn.dsmz.de/>), которая соответствует требованиям таксономии и постановлениям Международного кодекса номенклатуры прокариот (ICNP) [14, с.5607].

Для количественной оценки биоразнообразия прокариотных сообществ карбонатного чернозёма были рассчитаны основные индексы: Симпсона, Шеннона, Пиелу, Маргалёфа, Менхиникка и индекс полидоминантности Вильямса.

В результате метагеномного анализа верхнего слоя карбонатного чернозёма (0-20 см) на варианте с органикой было выделено 15 филумов: 2 филума архей и 13 бактериальных филумов. На контроле без применения удобрений было выделено только 13 филумов: 2 филума архей и 11 бактериальных филумов (рис. 1).

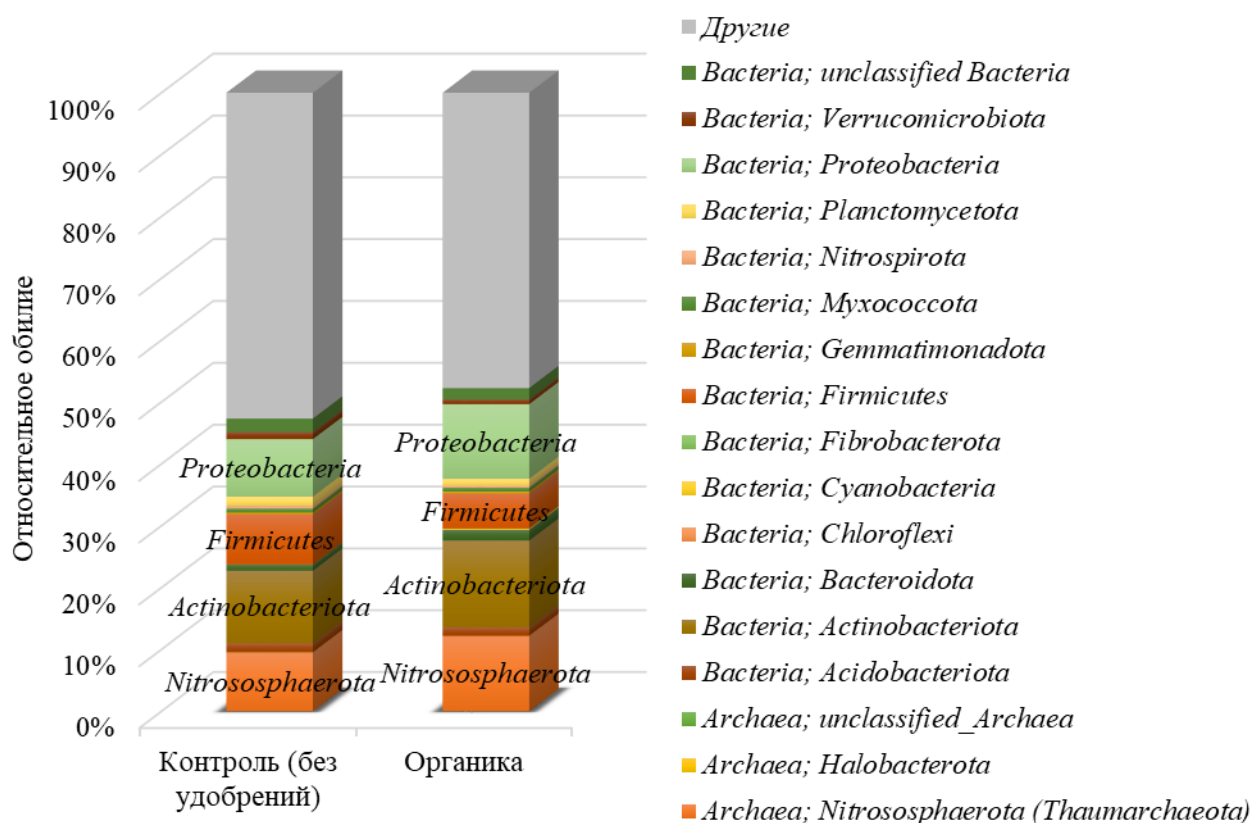


Рис. 1. Таксономический состав прокариот на уровне филума в верхнем слое карбонатного чернозёма (0-20 см) в условиях полевого севооборота с длительным применением удобрений

Основную часть почвенного прокариотного сообщества составляют следующие филумы бактерий: *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Myxococcota*, *Nitrospirata*, *Gemmatimonadota*. По численности преобладали бактериальные филумы *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и архейный филум *Nitrososphaerota*, известный также как *Thaumarchaeota*. Порядка 2%

бактерий не были классифицированы, среди архей неклассифицированными были только около 0,015%. Обнаружено довольно много неклассифицированных прокариот даже на уровне филумов – от 47,7 до 52,7% (рис. 1). При изучении микроорганизмов методом метагеномного секвенирования довольно часто обнаруживаются неклассифицированные организмы, это открывает перспективу для дальнейших исследований.

Доля доминирующих филумов, за исключением *Firmicutes*, существенно увеличивалась на варианте с навозом. Доля самого доминирующего филума *Actinobacteriota* увеличилась от 11,76% на контроле до 14,04% на органическом фоне, доля филума *Nitrososphaerota* (*Thaumarchaeota*) увеличилась от 9,47% до 12,16%, доля *Proteobacteria* увеличилась от 9,29% до 12,08%, а доля *Firmicutes* снизилась с 8,12% на контроле до 5,62% на фоне с органикой (рис. 2).

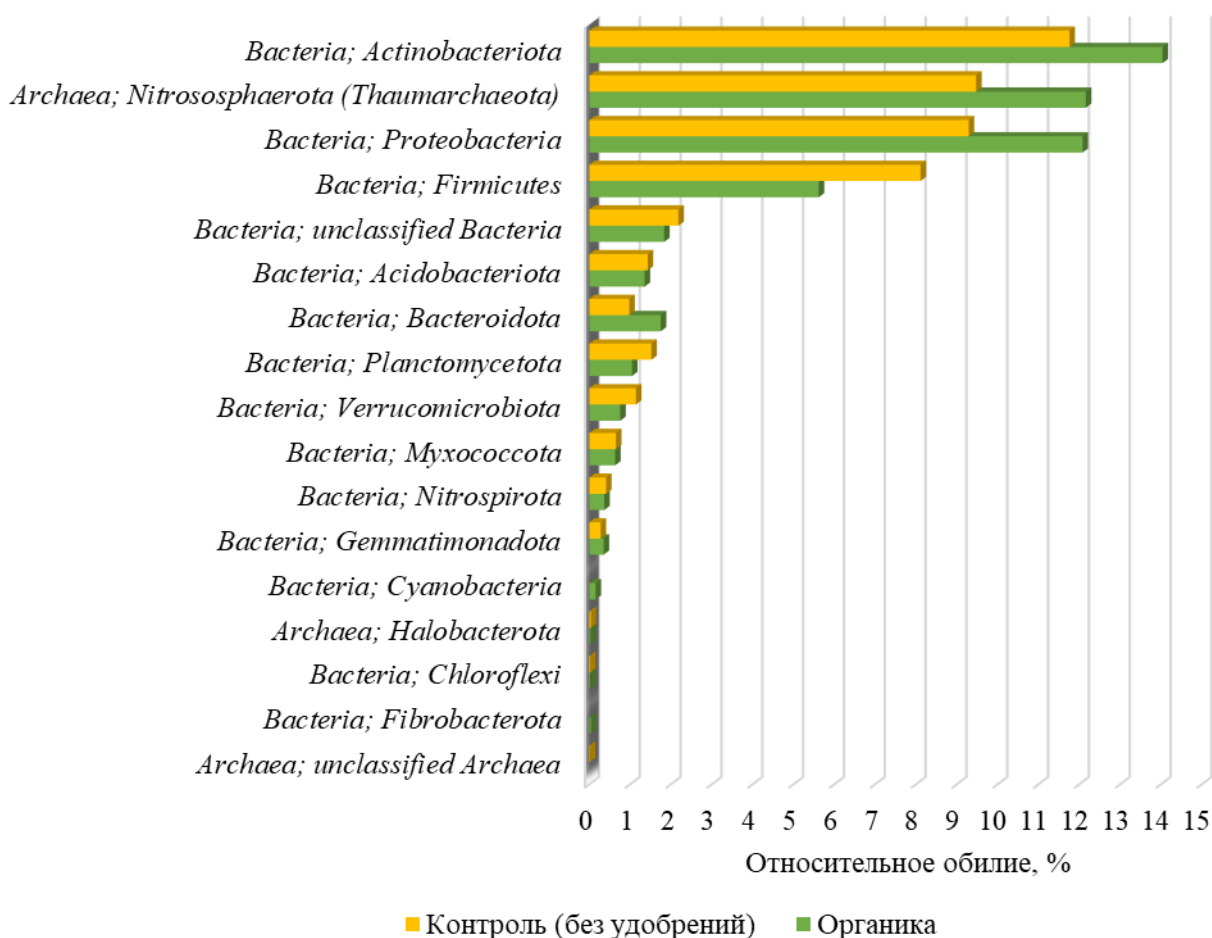


Рис. 2. Относительная частота встречаемости представленных филумов прокариот в верхнем слое карбонатного чернозема

Доли менее встречаемых филумов, за исключением *Gemmatimonadota* и *Bacteroidota*, снижались по сравнению с контролем (без удобрений): доля *Acidobacteriota* – с 1,43% до 1,36%, доля *Planctomycetota* – с 1,52% до 1,05%, *Verrucomicrobiota* – с 1,14% до 0,76%, *Мухосoccota* – с 0,65% до 0,63%, *Nitrospirota* – с 0,41% до 0,37%, доля *Bacteroidota* и *Gemmatimonadota* увеличилась соответственно от 0,98% до 1,75% и от 0,28% до 0,35% (рис. 2).

К наименее представленным филумам прокариот относится *Cyanobacteria*, а также следующие филумы с долей <0,1%: филум домена *Archaea* – *Halobacterota* и бактериальные филумы *Fibrobacterota* и *Chloroflexi* (рис. 3). *Cyanobacteria* и *Fibrobacterota* были обнаружены только на вариантах с органикой.

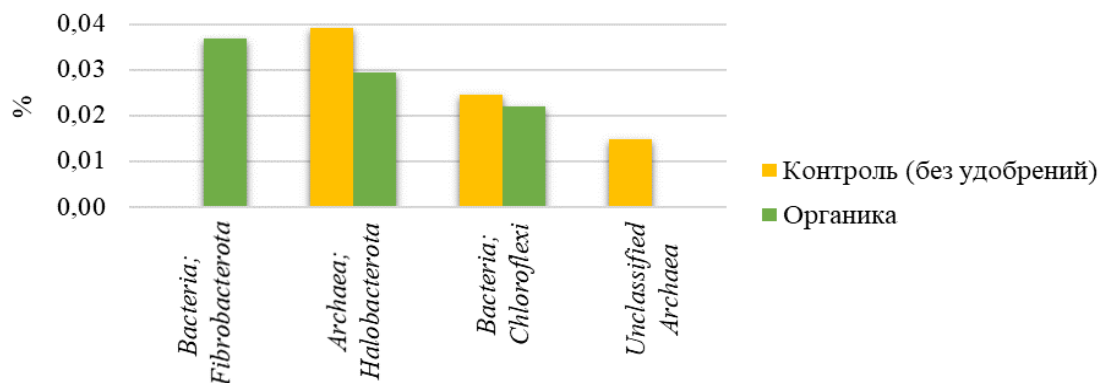


Рис. 3. Относительная частота встречаемости наименее представленных филумов прокариот (<0,1%) в верхнем слое карбонатного чернозема

Доли наименее представленных филумов *Halobacterota* и *Chloroflexi* уменьшались соответственно с 0,04% до 0,03% и с 0,025% до 0,022%. Неклассифицированные *Archaea* были обнаружены только на варианте без применения удобрений (рис. 3).

Было проведено сравнение видового богатства прокариотических микроорганизмов в верхнем слое 0-20 см карбонатного чернозёма на уровне филума с помощью ранжирования – кривых разнообразия прокариотного комплекса. Согласно кривым разнообразия, видовое богатство на уровне филума было выше на варианте с органикой, чем на контроле без внесения удобрений (рис. 4).

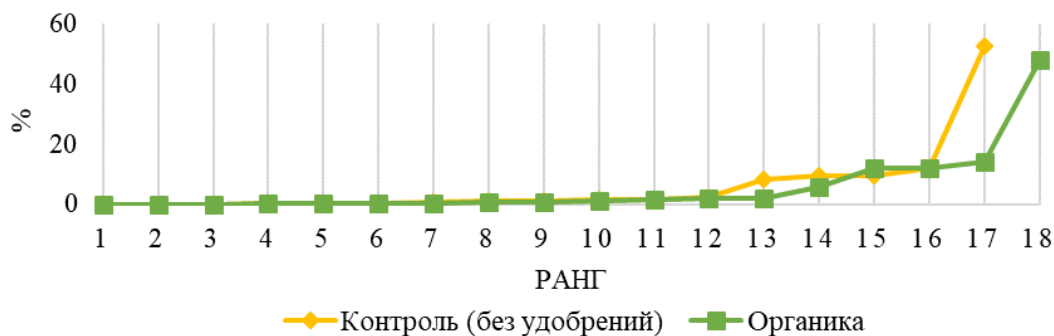


Рис. 4. Кривые разнообразия (ранжирование) прокариот на уровне филума в верхнем слое карбонатного чернозема (0-20 см)

Биоразнообразию прокариотных сообществ верхнего слоя (0-20 см) карбонатного чернозёма были оценены по основным экологическим индексам: Симпсона, Шеннона, Пиелу, Маргалефа, Менхиника и Вильямса. Известно, что чем ближе индекс доминирования Симпсона к 1, тем ниже разнообразие. На контроле индекс Симпсона был выше, чем на варианте с применением навоза, что свидетельствует о более низком разнообразии на контроле и более высоком разнообразии на органическом фоне (рис. 5).

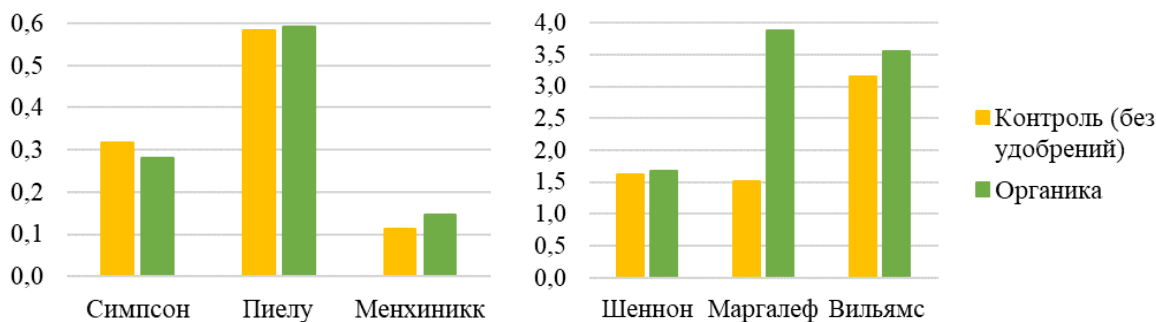


Рис. 5. Индексы биоразнообразия прокариот на уровне филума в верхнем слое карбонатного чернозема (0-20 см)

Увеличение индекса Шеннона, показателя видового разнообразия, говорит о возрастании неопределенности и однородности структуры системы. На варианте с органикой индекс Шеннона был немного выше, чем при длительном выращивании культур полевого севооборота без применения удобрений, то есть видовое разнообразие прокариотного сообщества было всё же больше в почве удобренной навозом. Индекс полидоминантности Вильямса также выше на варианте с органикой по сравнению с контролем, что также указывает на увеличение разнообразия от применения органических удобрений. Индекс Маргалефа, отражающий видовое богатство, был намного выше в почве варианта с длительным применением навоза, что также указывает на большое видовое богатство прокариотного сообщества на органическом фоне. Индекс видового богатства Менхиника и индекс Пиелу, характеризующий степень выравненности экологических сообществ (equitability, evenness), в почве с органикой были немного выше, чем на неудобренном варианте. Таким образом, все основные индексы биоразнообразия, рассчитанные в целом для сообщества, указывали на большее разнообразие на органическом фоне, по сравнению с контролем.

Выводы

Длительное применение органических удобрений, в частности навоза, изменило богатство прокариотного сообщества изучаемого верхнего слоя карбонатного чернозёма, увеличило биоразнообразие прокариот. На вариантах с длительным применением органических удобрений (навоза) с помощью высокопроизводительного секвенирования было выделено 15 филумов: 2 филума архей и 13 бактериальных филумов, а на контроле без применения удобрений – только 13 филумов: 2 филума архей и 11 бактериальных филумов.

Основную часть почвенного прокариотного сообщества составили один архейный филум *Nitrososphaerota (Thaumarchaeota)* и следующие бактериальные филумы: *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Muxococcota*, *Nitrospirota*, *Gemmatimonadota*. Филумы *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Nitrososphaerota (Thaumarchaeota)* были доминирующими филумами в прокариотном сообществе верхнего слоя (0-20 см) карбонатного чернозёма.

Применение навоза привело к существенному увеличению относительной численности таких филумов, как *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Nitrososphaerota (Thaumarchaeota)*, *Bacteroidota*, а также к уменьшению доминирующего филума *Firmicutes* и других менее представленных филумов. Менее представленные филумы *Cyanobacteria* и *Fibrobacterota* были обнаружены в слое 0-20 см только на вариантах с органикой.

Все основные индексы биоразнообразия (Симпсона, Шеннона, Пиелу, Маргалефа, Менхиника, Вильямса), рассчитанные в целом для сообщества, указывали на большее, более богатое разнообразие прокариотных сообществ карбонатного чернозёма на варианте с длительным применением органических удобрений (навоза) по сравнению с контролем (без удобрений). Таким образом, применение такого органического удобрения, как навоз приводит к повышению биоразнообразия прокариотных сообществ изученного верхнего слоя (0-20 см) карбонатного чернозёма.

Литература

1. AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 1995, 59, p. 143-169. ISSN: 1098-5557. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995> (IF: 13.044).
2. BARDGETT, R. D.; VAN DER PUTTEN, W. H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*. 2014, 515, p. 505–511. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature13855> (IF: 63.580).
3. BIRKHOFFER, K. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: for soil quality, biological control and productivity. *Soil*. 2008, 40, p. 2297–2308. ISSN: 1879-3428. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.007> (IF: 8.546).
4. BRUSSAARD, L.; DE RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2007, 121, p. 233–244. ISSN: 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.12.013> (IF: 6.576).
5. CARDINALE, B.J. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*. 2012, 486, p. 59–67. ISSN: 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature11148> (IF: 63.580).
6. COUDRAIN, V.; HEDDE, M.; CHAUVAT, M.; MARON, P.-A.; BOURGEOIS, E.; MARY, B.; LÉONARD, J.; EKELUND, F.; VILLENAVE, C.; RECOUS, S. Temporal differentiation of soil communities in response to arable crop management strategies. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2016, 225, p. 12–21. ISSN: 0167-8809. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.03.029> (IF: 6.576).
7. DELGADO-BAQUERIZO, M.; MAESTRE, F. T.; REICH, P. B.; JEFFRIES, T. C.; GAITAN, J. J.; ENCINAR, D.; SINGH, B. K. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*. 2016, 7, p. 10541. ISSN: 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541> (IF: 17.763).
8. DELGADO-BAQUERIZO, M.; REICH, P. B.; TRIVEDI, C.; ELDRIDGE, D. J.; ABADES, S.; ALFARO, F. D.; SINGH, B. K. Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. *Nature Ecology & Evolution*. 2020, 4, p. 210–220. ISSN: 2397-334X. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1084-y> (IF: 18.622).
9. FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, p. 4117-4120. ISSN: 1098-5336. <https://doi.org/10.1128/aem.71.7.4117-4120.2005> (IF: 4.716).
10. HAUTIER, Y.; TILMAN, D.; ISBELL, F.; SEABLOOM, E. W.; BORER, E. T.; REICH, P. B. Environmental changes affect ecosystem stability via biodiversity. *Science*. 2015, 348, p. 336–340. ISSN: 1095-9203 <https://doi.org/10.1126/science.aaa1788> (IF: 59.921).
11. HECTOR, A.; BAGCHI, R. Biodiversity and ecosystem multifunctionality. *Nature*. 2007, 448, p. 188–190. ISSN: 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature05947> (IF: 63.580).
12. JING, X.; SANDERS, N. J.; SHI, Y.; CHU, H.; CLASSEN, A. T.; ZHAO, K.; HE, J.-S. The links between ecosystem multifunctionality and above- and belowground biodiversity are mediated by climate. *Nature Communications*. 2015, 6, p. 8159. ISSN: 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/ncomms9159> (IF: 17.763).
13. LAUBER, C. L.; RAMIREZ, K. S.; AANDERUD, Z.; LENNON, J.; FIERER, N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME*. 2013, 7, p. 1641–1650. eISSN: 1751-7370. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.50> (IF: 13.214).
14. PARTE, A.C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; REIMER, L.C.; GÖKER, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020, 70, p. 5607-5612. E-ISSN: 1466-5034. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332> (IF: 2.9).
15. TSIAFOULI, M. A.; THÉBAULT, E.; SGARDELIS, S. P.; DE RUITER, P. C.; VAN DER PUTTEN, W. H.; BIRKHOFFER, K.; HEDLUND, K. Intensive agriculture reduces soil biodiversity across Europe. *Global Change Biology*. 2015, 21, p. 973–985. ISSN: 1365-2486. <https://doi.org/10.1111/gcb.12752> (IF: 13.111).
16. WAGG, C.; BENDER, S. F.; WIDMER, F.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *PNAS*. 2014, 111, p. 5266–5270. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111> (IF: 12.779).
17. WAGG, C.; HAUTIER, Y.; PELLKOFER, S.; BANERJEE, S.; SCHMID, B.; GA VAN DER HEIJDEN, M. Diversity and asynchrony in soil microbial communities stabilizes ecosystem functioning. *eLife*. 2021, 10, e62813. ISSN: 2050-084X. <https://doi.org/10.7554/eLife.62813>. (IF: 8.14).