

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

На правах рукописи

Семенов Михаил Вячеславович

**БИОМАССА И ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА АРХЕЙ И
БАКТЕРИЙ В ПОЧВАХ ПРИРОДНЫХ И
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Специальность 03.02.03 – микробиология

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор А.Л. Степанов

Москва – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРОКАРИОТНОГО ПОЧВЕННОГО СООБЩЕСТВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	9
1.1. Археи и бактерии как составляющие прокариотного комплекса почв	9
1.2. Систематика архей	16
1.2.1. Кренархеоты	17
1.2.2. Таумархеоты	18
1.2.3. Эвриархеоты	24
1.3. Специфические функции бактерий и архей в глобальных циклах углерода и азота	27
1.4. Методы определения микробной биомассы и активности почвенных микроорганизмов	42
1.4.1. Определение микробной биомассы и общей численности прокариот в почве	43
1.4.2. Определение активности почвенных архей и бактерий	49
1.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
2.1. Объекты исследований	59
2.1.1. Природные условия южного Подмосковья	59
2.1.2. Природные условия и почвы в Каменной Степи	62
2.1.3. Почвенно-экологические условия аридной зоны северного Прикаспия	64
2.1.4. Отбор почвенных образцов и газовых проб	66
2.2. Методы исследований	69
2.2.1. Определение микробной биомассы почв методом фумигации-экстракции и субстрат-индуцированного дыхания	69

2.2.2. Определение доли грибов и бактерий в биомассе почв методом селективного ингибирования субстрат-индуцированного дыхания	70
2.2.3. Экстракция и количественное определение ДНК	71
2.2.4. Определение численности метаболически активных клеток	73
2.2.5. Оценка численности бактерий, архей и грибов по количеству гена 16S рРНК	74
2.2.6. Амплификация и подготовка к секвенированию, секвенирование пула библиотек и обработка данных	75
2.2.7. Газохроматографический анализ газовых проб	77
2.2.8. Специальные расчеты и статистическая обработка результатов	77
2.3. Физико-химические свойства серой лесной, чернозема типичного и бурой полупустынной почвы	78
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	83
3.1. Измерение общей микробной биомассы методом количественной экстракции почвенной ДНК	83
3.1.1. Сравнение методов дцДНК, субстрат-индуцированного дыхания и фумигации-экстракции	83
3.1.2. Содержание общей микробной биомассы в почвах катены и горизонтах профиля	89
3.1.3. Заключение	93
3.2. Соотношение грибной и бактериальной биомассы в почве	94
3.2.1. Экспериментальное разделение дыхания бактериального и грибного компонентов сообщества	95
3.2.2. Доля грибного и бактериального компонентов биомассы в почвах катены	101
3.2.3. Заключение	104
3.3. Структура метаболически активного прокариотного комплекса почв	105

3.3.1. Содержание метаболически активных групп архей и бактерий в профиле серой лесной, черноземе и бурой полупустынной почве	107
3.3.2. Зависимость внутрипрофильного распределения архей и бактерий от химических свойств почвы	113
3.3.3. Содержание метаболически активных таксономических групп в составе архей в профиле почв катены	122
3.3.4. Сопоставление численности метаболически активных клеток бактерий и архей с количеством генов 16S рРНК	125
3.3.5. Размеры метаболически активной биомассы архей и бактерий	129
3.3.6. Заключение	131
3.4. Таксономическая структура бактерий и архей почвенных микробиомов	133
3.4.1. Таксономическая структура микробиома чернозема типичного	134
3.4.2. Таксономическая структура микробиомов серой лесной и аллювиально-луговой почв катены	137
3.4.3. Метаногенно-метанотрофное сообщество серой лесной и аллювиально-луговой почв катены и обмен метана в системе почва-атмосфера	149
3.4.4. Заключение	155
ВЫВОДЫ	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	158

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. Почвенный биом представляет собой систему прокариотных и эукариотных сообществ со свойственным им филогенетическим и функциональным разнообразием. Прокариоты являются «элементарной единицей и универсальной основой жизни» [Заварзин, Колотилова, 2001]. Примерно 5% от общего количества прокариот на Земле, оцениваемого в пределах 10^{28} – 10^{30} организмов, сосредоточено в почве [Prosser et al., 2007; Schmidt, 2006; Whitman et al., 1998]. Прокариотный комплекс включает два домена – Bacteria и Archaea. Археи – это гетерогенная группа микроорганизмов, отличающаяся от бактерий химической структурой липидов, составляющих цитоплазматическую мембрану, наличием уникальных катаболических путей, способностью функционировать в средах с низкой доступности энергии [Valentine, 2007]. На долю архей приходится 0.5-3.8% всех прокариот, заселяющих аэробные почвы умеренной зоны климата [Ochsenreiter et al., 2003; Ruppel et al., 2007]. В отдельных исследованиях почвенные археи составляли 12-38% от пула гена 16S рРНК [Kemnitz et al., 2007].

Часть процессов, слагающих биогеохимические циклы углерода, азота, серы и железа осуществляются исключительно прокариотами. Почвенные прокариоты выступают агентом трансформации органических остатков, мобилизуют и иммобилизуют макро- и микроэлементы, контролируя их биогеохимический круговорот, участвуют в обмене газов, поддерживают продукционный потенциал наземных экосистем благодаря симбиозам и ассоциациям с растениями [Звягинцев, 1987; Умаров, 1998; Умаров и др., 2007]. Бактериям и археям присущи как сугубо специфические, так и одинаковые функциональные характеристики. Частичное перекрытие экологических функций бактерий и архей в биосфере предопределяет необходимость их совместного изучения.

Наряду с классическими методами выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов, определения численности, состава,

структуры и активности почвенного микробного сообщества широкое распространение получают новые молекулярно-генетические подходы и способы определения таксономического и функционального разнообразия микроорганизмов. Микроорганизмы, которые не так давно считались «типичными» представителями почв (бациллы, псевдомонады, актинобактерии), при изучении молекулярно-биологическими методами зачастую оказываются малочисленными, а некоторые из недавно открытых групп некультивируемых микроорганизмов – не только повсеместно распространены, но и доминирующими в почвах [Killham, Prosser, 2007]. Поэтому необходима перепроверка ареалов распространения и экологических ниш микроорганизмов, уточнение природы и механизмов их адаптаций, раскрытие междоменных и межвидовых взаимоотношений.

Цель исследований. Количественная оценка содержания ДНК и определение состава и таксономической структуры прокариотного комплекса почв природных и сельскохозяйственных экосистем.

Задачи исследований. 1. Определить содержание общей микробной биомассы в черноземе типичном, серой лесной и бурой полупустынной почве на основе количественной экстракции дцДНК.

2. Установить соотношение бактериальной и грибной биомассы в почвах катены методом селективного ингибирования субстрат-индуцированного дыхания.

3. Определить характер внутрипрофильного распределения метаболически активных архей и бактерий и показать зависимость их соотношения от содержания углерода и азота в почве.

4. Выявить таксономическую структуру и доминирующие таксоны в составе архейного и бактериального сообществ почв с использованием молекулярно-биологических методов.

5. Показать специфику состава метаногенного и метанотрофного сообществ почв катены в местах превалирования эмиссии или поглощения метана.

Научная новизна. Разработана процедура нового метода оценки микробной биомассы почв на основе количественного определения почвенной дцДНК. С помощью современных молекулярно-биологических методов (FISH, кПЦР, секвенирование) получены закономерности распределения новых таксонов архей и бактерий в почвах природных и сельскохозяйственных экосистем. Впервые показана высокая численность и доминирование родов бактерий, которые ранее не обнаруживались в почвах с помощью традиционных микробиологических методов (*Chtoniobacter flavus*, *Caldithrix palaeochoryensis*, *Pelotomaculum isophthalicum*). С помощью метода секвенирования гена 16S рРНК показано, что представители филума *Verrucomicrobia* доминировали в серой лесной почве и черноземе типичном естественных экосистем, а среди видов наиболее представленным был *Chtoniobacter flavus*. Показано, что в метаногенном сообществе почв катены доминируют виды *Methanolobus taylori*, *Methanococcoides methylutens*, *Methanosaeta concilii* и *Methanosaeta pelagica*, а в метанотрофном – *Methylosinus pucelana* и *Methylosinus acidophilus*.

Практическая значимость. Результаты исследований могут быть использованы при расчете запасов микробного углерода в почвах разных климатических зон, оценке участия почвенных прокариот в углеродно-азотном метаболизме и обмене парниковых газов. Соотношение метаболически активных бактерий и архей предложено использовать в качестве эколого-трофического индекса состояния микробного сообщества почв. Определены таксоны бактерий и архей, наиболее чувствительные к агрогенным воздействиям либо выступающие индикатором обмена метана в почве. Результаты исследований могут быть рекомендованы для использования в спецкурсах по биологии почв и экологии микроорганизмов.

Декларация личного участия. Автор работы лично разрабатывал способ количественного измерения микробного углерода в почве по количеству экстрагированного дцДНК, занимался подбором концентраций антибиотиков, обеспечивающих наибольшее подавление субстрат-

индуцированного дыхания грибов и бактерий, готовил и проводил микроскопирование препаратов метаболически активных клеток, выполнял анализ данных секвенирования с помощью программного обеспечения Illumina, осуществлял статистическую обработку массива экспериментальных данных, интерпретацию выявленных фактов и сопоставление их с литературными материалами, представлял исследования на научных конференциях, готовил публикации и настоящую рукопись.

Поддержка и благодарности. Диссертационная работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Часть экспериментальных материалов получена в рамках проектов, поддержанных Германской службой академических обменов (DAAD program «Forschungsstipendien für Doktoranden und Nachwuchswissenschaftler», 2013-2014 г.), Российским научным фондом (№№ 14-14-00625 и 14-26-00079), Ведущей научной школой (№ НШ_6620.2012.4) и Российским фондом фундаментальных исследований (№ 08-04-92218-ГФЕН_a и № 15-29-02499_a). Автор выражает признательность и благодарность научному руководителю, д.б.н., профессору А.Л. Степанову, д.б.н., профессору Н.А. Манучаровой, д.б.н. Ананьевой, к.б.н. Е.В. Благодатской, к.б.н. И.К. Кравченко, д.с-х.н. Б.М. Когуту, к.с-х.н. О.В. Кутовой, к.б.н. Е.А. Ивановой, к.с-х.н. А.К. Тхакаховой, Т.И. Чернову и А.Д. Железовой за ценные советы при выборе темы и объектов исследований, помощь в обобщении экспериментального материала и полезные консультации. Большое содействие в формировании исследовательских навыков оказали заведующий кафедрой биологии почв, чл.-корр. РАН И.Ю. Чернов, сотрудники и преподаватели кафедры биологии почв МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор Университета Геттингена Я.В. Кузяков, директор Почвенного Института имени В.В. Докучаева академик РАН А.Л. Иванов, родители Н.А. Семенова и д.б.н. В.М. Семенов.

ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРОКАРИОТНОГО ПОЧВЕННОГО СООБЩЕСТВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. АРХЕИ И БАКТЕРИИ КАК СОСТАВЛЯЮЩИЕ ПРОКАРИОТНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧВ

Почвенные микроорганизмы выступают агентом трансформации органических остатков и питательных элементов, драйвером биотических процессов, а их биомасса является транзитно-метаболическим пулом почвенного органического вещества, динамическим источником и стоком углерода, азота, фосфора и серы. Основное количество колониеобразующих единиц почвенных микроорганизмов ассоциировано с органическим материалом, распределенным в конгломерате минеральных частиц. Микроорганизмы трансформируют 85-90% всех содержащихся в почве органических материалов, мобилизуют элементы из труднодоступных форм, вовлекая их биогеохимический круговорот, благодаря симбиозам и ассоциациям с растениями придают устойчивость и упругость почвенной системе, поддерживают продукционный потенциал наземных экосистем [Звягинцев, 1987; Умаров, 1998; Wolters, 2000].

Общее количество прокариот на Земле оценивается в пределах 10^{28} - 10^{30} организмов [Schmidt, 2006; Prosser et al., 2007]. Пул углерода прокариот составляет 60-100% от углерода, содержащегося в растениях. Прокариоты представляют собой самые большие пулы азота и фосфора среди живых организмов [Whitman et al., 1998]. В почве представлено примерно 5% всех прокариотных жизненных форм [Whitman et al., 1998]. Почвы заключают в себе уникальное и огромное по масштабам разнообразие микробных популяций: один десятиграммовый почвенный образец может содержать 10^3 – 10^7 различных микробных видов/генотипов [Schloss, Handelsman, 2006]. Из прокариот, живущих в аэробных почвах умеренной зоны климата, около 0.5-3.8% составляют археи [Ochsenreiter et al., 2003; Ruppel et al., 2007].

Археи остаются наименее изученной группой организмов среди трех доменов жизни. Представители этого домена были впервые отделены от бактерий по причине существенных отличий тРНК и рРНК, цитоплазматической мембраны и состава клеточной стенки, а также распространения в экстремальных местообитаниях [Woese et al., 1978]. Дальнейшие исследования показали специфику архей в аппарате транскрипции и трансляции, что привело к отделению архей от бактерий в качестве отдельного домена жизни [Allers, Mervarech, 2005]. Первые описанные археи были выделены из природных сред, которые характеризовались экстремально высокими уровнями солености, температуры, кислотности или строгой аноксии, что привело к предположению, что данная группа организмов присуща только для экстремальных условий. Экологическая парадигма об экстремофильности архей была подвергнута сомнению после их обнаружения в океане [DeLong, 1992; Fuhrman et al., 1992]. Впоследствии археи были найдены в самых разнообразных местах обитания, включая гидротермальные жерла [Ehrhardt et al., 2007], морские воды [DeLong, 1992], гиперсоленые отложения [Demergasso et al., 2004], пресноводные отложения [Schleper et al., 1997] и почвы [Bintrim et al., 1997; Buckley et al., 1998; Oline et al., 2006]. Количество архей *Crenarchaeota* в почвах оценивается обычно в пределах 1-2% от общего количества прокариот [Buckley et al., 1998; Gattinger et al., 2002; Sandaa et al., 1999]. Среди известных исследований наибольший процент почвенных архей достигал 12-38% от пула гена 16S рРНК [Kemnitz et al., 2007].

Изучение экологической общности среди различных представителей архей показало, что адаптация к хроническому энергетическому стрессу (низкие концентрации углерода, низкая доступность, или низкое качество субстрата) является решающим фактором, который обуславливает отличие архей от бактерий. Основным биохимическим базисом для такой адаптации служит состав мембраны, а также многочисленные специфические

метаболические пути, присущие археям [Valentine, 2007]. Для объяснения энергетических адаптаций используются такие понятия, как энергия поддержания (ЭП) и квант биологической энергии (КБЭ). ЭП определяется как минимальная энергия, идущая от катаболизма, которая необходима для поддержания клеточной активности (отличается от энергии, необходимой для роста или для выживания) [Voetius et al., 2000; Hallam et al., 2004; Price, Sowers, 2004]. Под КБЭ понимается минимальный катаболический выход энергии, который необходим для сохранения организма, обычно включающий в себя хемоосмотический потенциал. КБЭ является одним из важнейших свойств ЭП у анаэробов.

Экологические различия между археями и бактериями находят свое отражение в генетических и биохимических адаптациях. Особый набор липидов в составе архейной мембраны является основным видом адаптации к энергетическому стрессу. Адаптационными считаются также специфические катаболические пути, а также механизмы консервации энергии. По-видимому, археи используют специфические мембранные структуры, которые сокращают потери энергии на клеточном уровне, а значит и ЭП архей по сравнению с бактериями [Valentine, 2007].

Липидные мембраны. Все прокариоты сталкиваются с энергетической дилеммой в цитоплазматической мембране: каждая клетка должна тратить энергию, чтобы поддерживать хемоосмотический потенциал, который используется при управлении основными клеточными процессами. Мембрана функционирует как барьер для этого потенциала, и случайное прохождение ионов через мембрану приводит к ненужному перемещению ионов, и соответственно, к прямой потере энергии клеткой. Организмам требуется точная работа мембраны, чтобы избегать ненужных передвижений ионов и сводить к минимуму ЭП. С другой стороны, мембрана контролирует многие другие клеточные процессы: например, радиальный транспорт напрямую связан с проницаемостью мембраны [Kendall et al., 2007].

Одним из важных различий между археями и бактериями является химическая структура липидов, составляющих цитоплазматическую мембрану (рис. 1).

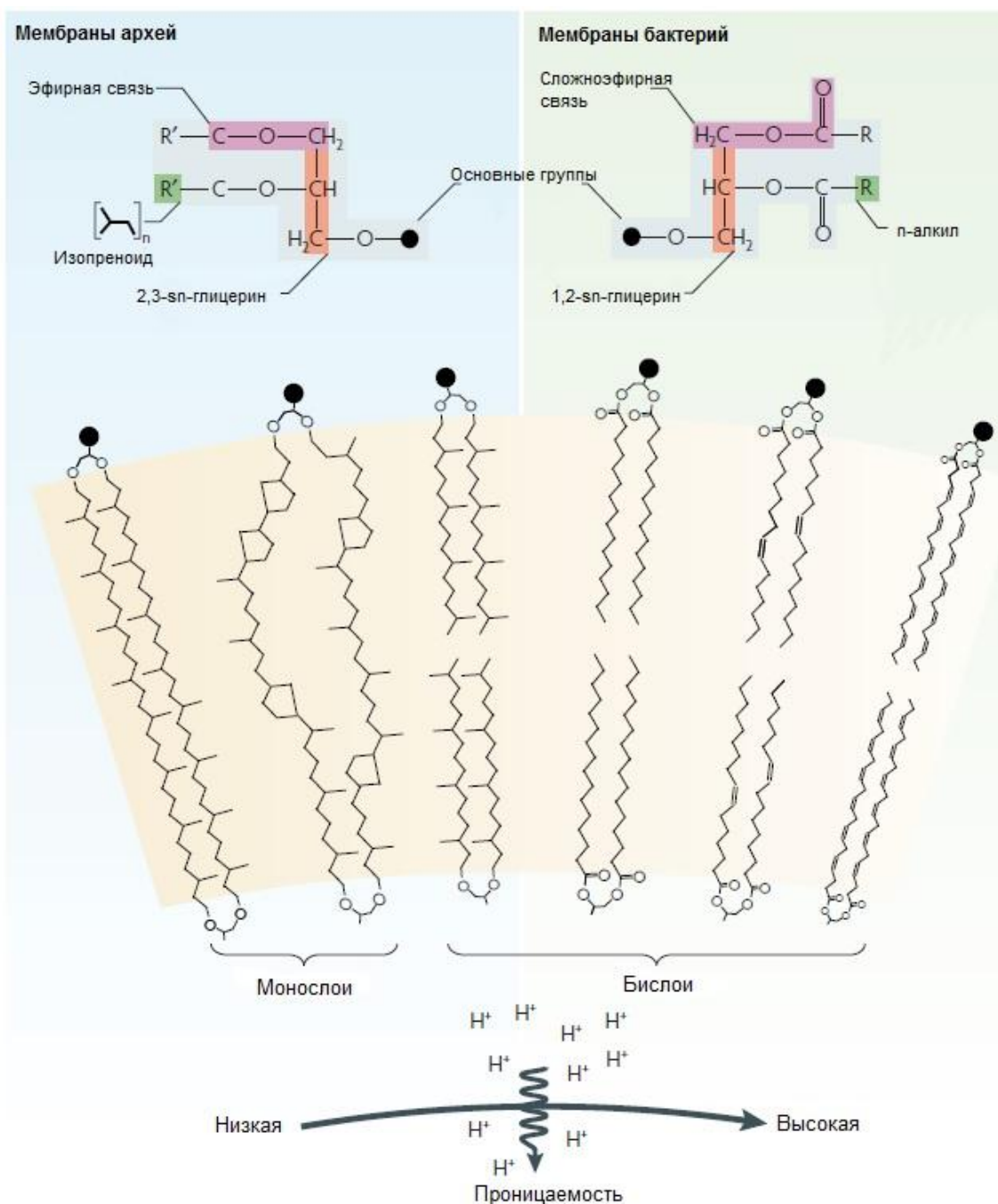


Рис. 1. Различия в строении мембран архей и бактерий. Стрелка (внизу) указывает на общую тенденцию к увеличению проницаемости для ионов, таких как Na^+ и H^+ [Valentine, 2007].

Бактериальные липиды обычно состоят из жирных кислот, этерифицированных глицериновыми фрагментами, тогда как архейные

липиды обычно состоят из изопреноидных спиртов, которые соединены с глицерином через эфирные связи. Стереохимическая конфигурация липидов архей и бактерий относительно глицериновой группы также различна. Мембраны архей менее проницаемы для ионов по сравнению с бактериальными, поскольку тетраэфирные мембраны менее проницаемы, чем диэфирные [Mathai et al., 2001; Yamauchi et al. 1993]. Эти мембраны уменьшают количество неэффективных ионных циклов в естественных условиях и обеспечивают энергетическое преимущество архей относительно бактерий: меньше энергии теряется при поддержании хемоосмотического потенциала. Данная адаптация эффективно снижает ЭП архей по сравнению с бактериями. Преимущества архейной мембраны были четко показано на примере гипертермофилов, галофилов и ацидофилов [Macalady et al., 2004; Van de Vossenberg et al., 1995; 1998a; 1998b; 1999; Mathai et al., 2001].

Катаболические и энергетические преимущества архей. Изначально считалось, что археи являют собой разрозненный набор фенотипов: метаногены, экстремальные галофильные и термофильные виды. Известная широта катаболических функций архей расширилась и теперь включает в себя аэробноз, брожение, нитрификацию, фототрофию и множество вариантов литотрофии [Chaban, Jarrell, 2006]. Катаболическая специфика архей также объясняется адаптацией к хроническому энергетическому стрессу.

Успешное распространение галофилов, гипертермофилов и термоацидофилов реализуется путем использования *исключительности среды*, то есть эти группы адаптированы таким образом, чтобы функционировать при таком уровне энергетического стресса, при котором может существовать лишь очень узкая группа организмов. Это достигается путем эффективного противодействия факторам среды (температура, соленость и кислотность), которые имеют тенденцию увеличивать ЭП. Экологическая исключительность сменяется на конкуренцию с бактериями, когда условия становятся умеренными (рис. 2), и возможность

существования архей становится более зависимой от катаболических адаптаций. В случае с метаногенами и метанотрофами, доминирование архей достигается за счет *метаболической исключительности*, по пути которой эти организмы эволюционировали, чтобы исключить или вытеснить бактерии путем использования уникальных катаболических путей.

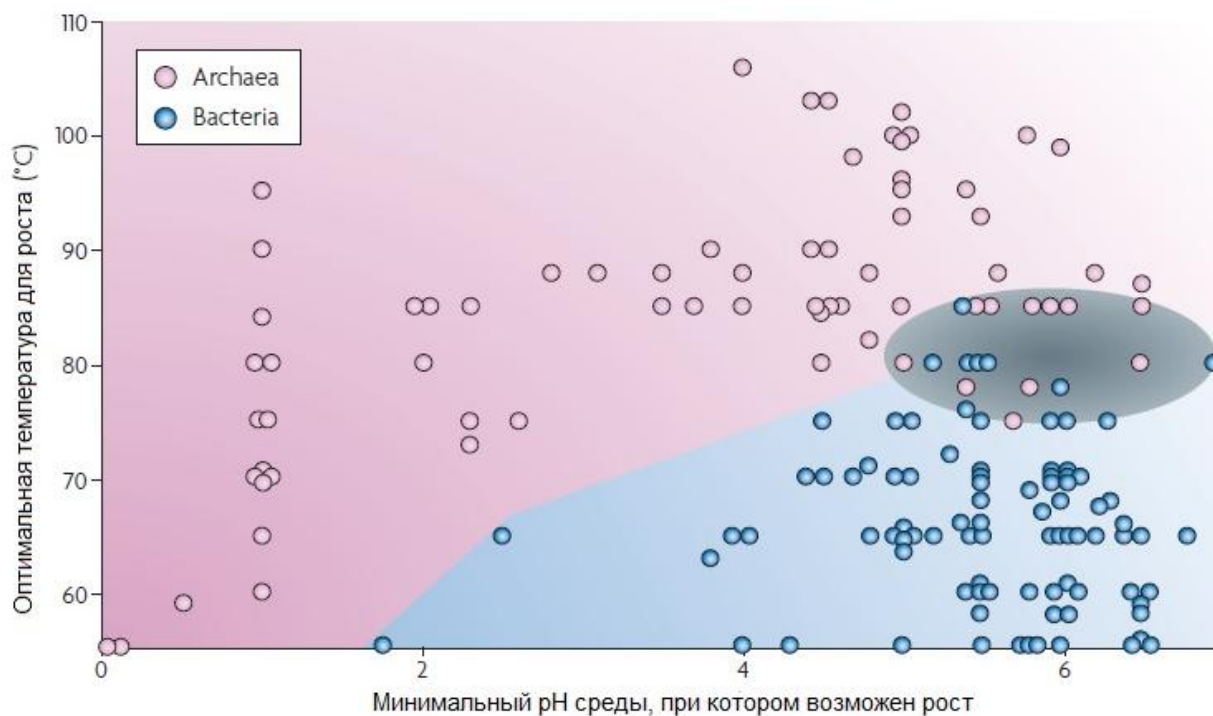


Рис. 2. Различия бактерий и архей по отклику к температуре и pH среды, необходимых для роста [Valentine, 2007]. Археи представлены 72 видами из 32 родов (розовые точки), бактерии представлены 107 видами из 61 родов (синие точки). Археи-метаногены не учитывались. Голубая "зона" включает в себя условия среды, к которым наиболее хорошо приспособлены бактерии, розовая "зона" соответствует условиям среды, к которым наиболее хорошо приспособлены археи. Серая зона представляет условия, к которым приспособлены как археи, так и бактерии.

Термофилы, ацидофилы и галофилы используют исключительность среды в экстремальных условиях и могут поддерживать широкую катаболическую специфику, поскольку их основная энергетическая адаптация связана с условиями среды. Эти организмы сохраняют энергетическое преимущество в виде низкого ЭП при высоких (но не экстремальных) температурах, засоленности и кислотности. Уровень конкуренции между археями и бактериями усиливается в умеренных

условиях окружающей среды, и успешно существующие археи поддерживают уникальность катаболизма, что позволяет им исключить или вытеснить бактерии в определенных нишах с низкой доступности энергии. Метаногены, метанотрофы и, вероятно, нитрификаторы поддерживают уникальность катаболизма с акцентом на одном хорошо определенном пути.

Помимо катаболических адаптаций, специфические механизмы сохранения энергии являются отличительной адаптационной чертой многих архей. Такие механизмы включают в себя метаногенез, анаэробное окисление метана, H_2 -зависимое восстановление серы и фототрофию [Chaban, Jarrell, 2006; Sapro et al., 2003]. H_2 / CO_2 - метаногенез является одним из наиболее изученных катаболических путей архей, представляя собой пример того, как особенности катаболизма и занимаемой экологической ниши могут отражать приспособленность к условиям хронического стресса. Прежде всего, экономия энергии достигается за счет хемоосмотического механизма, часто с переносом только одного иона за один этап катаболизма [Hoehler, 2004]. Для некоторых метаногенов может меняться стехиометрия переноса энергии из субстратов, что является очевидной адаптацией к низким и изменяющимся значениям свободной энергии Гиббса [de Poorter et al., 2003]. Некоторые метаногены дифференциально выделяют связанные с катаболизмом изоферменты в соответствии с доступностью субстрата [Reeve et al., 1997]. Наконец, путь H_2 / CO_2 обеспечивает высокую степень обратимости в условиях низкой обеспеченности энергией, что является свидетельством высокой эффективности использования энергии археями-метаногенами [Penning et al., 2005; Valentine et al., 2004].

Таким образом, особенности катаболизма в сочетании с многочисленными приспособлениями для функционирования в условиях энергетического стресса позволяют метаногенам успешно вытеснять бактерий в средах, где CO_2 является основным акцептором электронов [Hoehler et al., 1998; 2001; Zinder, 1993]. Способность сохранять небольшие

объемы метаболически полезной энергии во время катаболизма является ключом к выживанию в анаэробных энергетически бедных средах.

1.2. СИСТЕМАТИКА АРХЕЙ

С момента выделения архей количество известных архейных таксонов продолжает постоянно увеличиваться. Уже сейчас выделено более ста культивируемых родов архей, включающих в себя свыше 450 видов [http://www.bacterio.cict.fr]. Однако большинство представителей архей, описанных в настоящее время в реферативных базах, остаются некультивируемыми [Schleper et al., 2005] и известны лишь по наличию последовательностей гена 16S рРНК [DeLong, Pace, 2001]. Культивируемые и некультивируемые таксоны архей представлены на рис. 3.

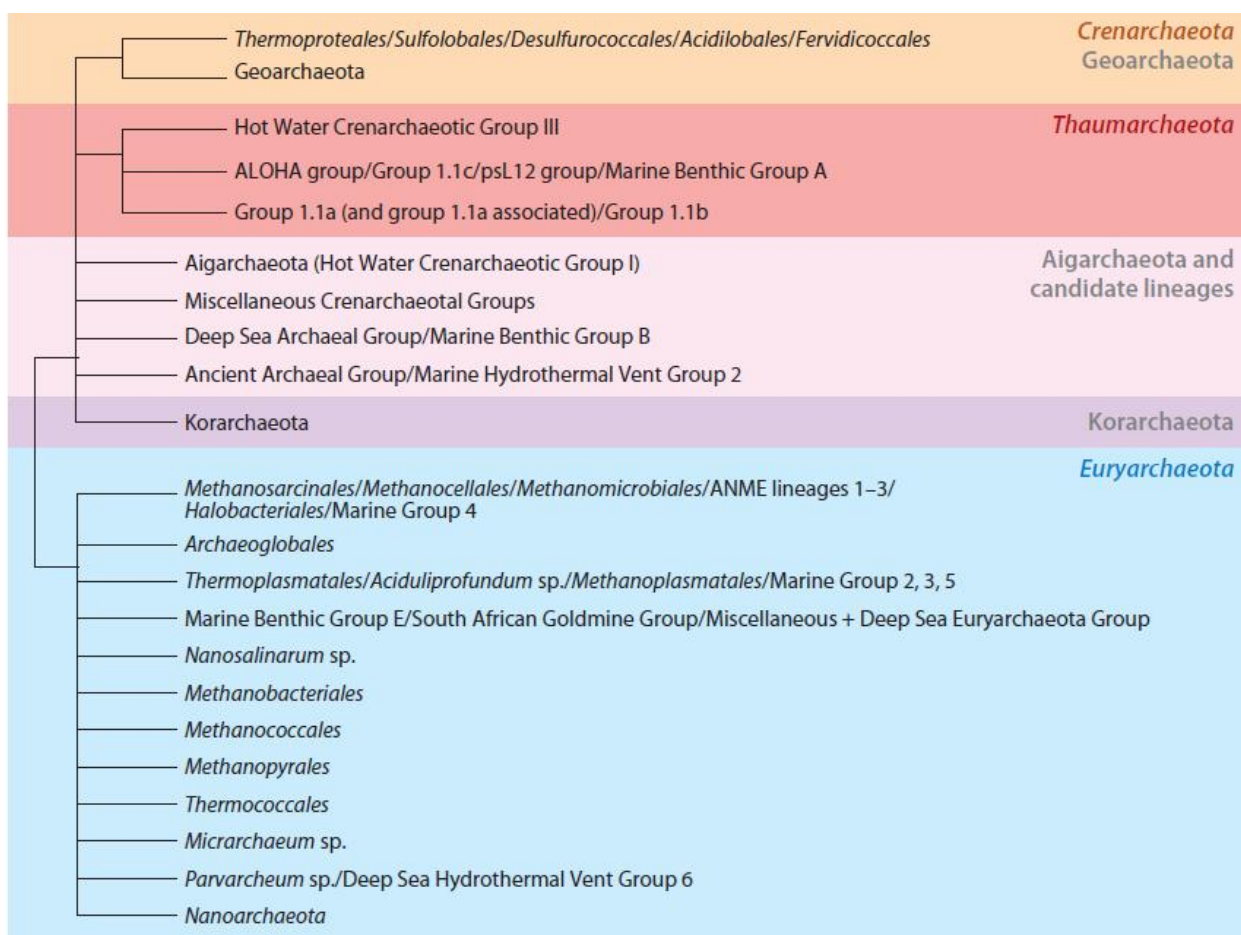


Рис. 3. Схема филогенетического разнообразия архей. Серым шрифтом указаны не филумы, не являющиеся общепризнанными среди научного сообщества [Offre et al, 2013].

При изучении архей, обитающих в почве, имеет смысл останавливаться на филумах *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*, поскольку представители остальных филумов (например, *Korarchaeota* и *Nanoarchaeota*) являются чрезвычайно редкими группами, не встречающимися в почвах.

1.2.1. КРЕНАРХЕОТЫ

Кренархеоты (*Crenarchaeota*) представляют собой один из основных филумов в составе домена Archaea. На данный момент *Crenarchaeota* включает в себя лишь один класс *Thermoprotei* и пять порядков: *Acidilobales*, *Desulfurococcales*, *Fervidicoccales*, *Sulfolobales* и *Thermoproteales* [Offre et al., 2013].

Изначально считалось, что данная группа является исключительно экстремофилами [Woese et al., 1990], однако исследования рРНК из разных сред позволяет говорить о том, что кренархеоты являются наиболее распространенными среди архей в морских экосистемах [Brock Biology..., 2006]. Представители кренархеот были обнаружены в проточной горячей воде. В настоящее время их находят в термальных источниках, вулканических котлах, мини-вулканах, горячих ключах, илах геотермальных участков под водой и вулканических почвах.

Одним из наиболее описанных представителей кренархеот является *Sulfolobus solfataricus*. Этот микроорганизм был впервые выделен из серных источников, и способен расти при температуре 80 °С и pH 2-4 [Zillig et al., 1980]. Близкие виды рода *Sulfolobus* обнаружены в различных местообитаниях. В отличие от подавляющего большинства культивируемых термофилов, *Sulfolobus* проявляет хемоорганотрофные свойства и растет в аэробных условиях. Благодаря этому данный микроорганизм относительно легко культивировать по сравнению с археями-анаэробами, в результате чего *Sulfolobus* стал модельным микроорганизмом для изучения гипертермофилов.

С момента первых исследований распространения данного филума в почвенных и морских обитаниях, было обнаружено большое количество сиквенсов гена 16S рРНК кренархеот в умеренных экосистемах [Nicol et al., 2003; Ochsenreiter et al., 2003; Pesaro and Widmer, 2002]. Вклад кренархеот в общее количество последовательностей 16S рРНК был оценен в 1-2% для пахотных [Buckley et al., 1998] и 0.3-0.5% для песчаных почв [Ochsenreiter et al., 2003]. Представители филума *Crenarchaeota* также были обнаружены в ризосфере сельскохозяйственных культур [Chelius and Triplett, 2001; Pesaro, Widmer, 2002] и микоризосфере шотландской сосны [Bomberg et al., 2003]. В то же время было показано, что ризосфера не является наиболее благоприятной средой для кренархеот: количество кренархеотной рДНК в почве вне корней было выше такового в ризосфере в 3-18 раз [Ochsenreiter et al., 2003].

Несмотря на то, что в упомянутых работах кренархеоты представляют собой устойчивый и универсальный компонент почвенного микробного сообщества, открытие нового домена *Thaumarchaeota* полностью перевернуло господствующие представления о распространении архейных таксонов в почвах.

1.2.2. ТАУМАРХЕОТЫ

В 1992 году была открыта новая группа архейных 16S рРНК сиквенсов, которая была обозначена как родственная мезофильная группа в составе гипертермофильных кренархеот [Fuhrman et al., 1992; DeLong, 1992]. Когда стало очевидно, что эта новая группа содержала аммонийоксиляющие археи (АОА), эти организмы были отнесены к "особым" мезофильным *Crenarchaeota*. Однако такое обозначение данной группы было оспорено после филогенетического анализа первого доступного генома АОА - *Candidatus Cenarchaeum symbiosum*. Оказалось, что *Candidatus Cenarchaeum symbiosum* ответвился от кренархеот до их расхождения с эвриархеотами. На основе филогенетического анализа, а также анализа на наличие/отсутствие

генов, было предложено отнести представителей этой группы к новому филуму – *Thaumarchaeota* [Brochier-Armanet et al., 2008]. Позже, филогенетический анализ сцепленных рибосомальных белков и других маркерных генов аммонийоксиляющей археи *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* – представителя морской группы I.1a, а также *Candidatus Nitrososphaera gargensis* – представителя почвенной группы I.1b показал принадлежность АОА к отдельной группе таумархеот [Spang et al., 2010]. В соответствии с этим выводом, сравнительная геномика показала, что 6 консервативных участков и более 250 белков оказались уникальными для представителей таумархеот *C. symbiosum* и *N. pumilus*, и не обнаруживались в кренархеотах [Gupta, Shami, 2011]. Еще одним аргументом в пользу выделения таумархеот в отдельный филум стал сравнительный анализ фозмидных клонов, полученных из разных глубоководных местообитаний. Среди 200 дендрограмм групп белков, присутствующих в таумархеотных фозмидах, таумархеотные последовательности разветвляются как отдельный кластер, отличный от гипертермофильных *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota* [Brochier-Armanet et al., 2011]. Независимо от геномных данных, наличие липида кренархеола во всех анализированных АОА [Damste et al., 2002; De La Torre et al., 2008; Pitcher et al., 2010; Schouten et al., 2008] согласуется с отделением этих организмов от кренархеот на архейном филогенетическом древе, поскольку этот липид не найден в составе остальных прокариотных организмов. Таким образом, вполне вероятно, что данный мембранный липид, который в настоящее время более уместно называть таумархеол вместо кренархеола, впервые появился именно у таумархеотного организма, и является липидом-детектором для представителей таумархеот. Пересмотр размещения *Thaumarchaeota* на филогенетическом древе на основе 16S рРНК также показало четкое разделение этого филума от *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota* (рис. 3).

К настоящему времени большинство представителей филума *Thaumarchaeota* остаются в числе некультивируемых (Stahl, De la Torre et al.,

2012), но все культивируемые формы способны к окислению аммиака. Таумархеоты широко распространены в природе и встречаются в морских и пресноводных экосистемах, почвах, осадках и даже экстремальных горячих источниках [Offre et al., 2013].

Однако до сих пор остается не ясным, являются ли АОА строгими автотрофами, или же они также могут ассимилировать органические субстраты. Для *N. maritimus*, была показана автотрофность [Könneke et al., 2005], а для *N. gargensis* экспериментально продемонстрирована CO₂-фиксация [Hatzenpichler et al., 2008]. Включение меченого бикарбоната в липиды, белки и клетки морских *Thaumarchaeota* [Herndl et al., 2005; Wuchter et al., 2003; Yakimov et al., 2011], согласующееся с представлением об их автотрофности, работает по принципу модифицированной 3-гидроксипропионата / 4-оксибутирата (HP / HB) цикла для CO₂-фиксации, и найдена во всех известных геномах АОА, а также в морских таумархеотных фозмидах [Hallam et al., 2006; La Cono et al., 2010; Martin-Cuadrado et al., 2008; Walker et al., 2010].

Анализ геномов *C. symbiosum* and *N. maritimus* показал наличие цикла Кребса и возможность переноса аминокислот, олигопептидов и глицерина [Hallam et al., 2006; Martin-Cuadrado et al., 2008; Walker et al., 2010]. Исследования с использованием стабильного изотопа углерода в составе ¹³CO₂ показали аммонийоокисляющую активность представителей группы I.1a. и I.1.b таумархеот, обитающих в почве [Pratscher et al., 2011; Xia et al., 2011; Zhang et al., 2010], что говорит о наличии автотрофного и миксотрофного метаболизма. В этих исследованиях углеродная метка была найдена в генах или транскриптах 4-гидроксibuтирил-CoA- дегидратазы [Zhang et al., 2010] и ацетил-CoA-пропионил-CoA-карбоксилазы [Pratscher et al., 2011], вовлеченных в CO₂-фиксирующий HP / HB цикл [Berg et al., 2010]. Тем не менее, рост почвенных АОА одновременно с отсутствием сопутствующего включения ¹³CO₂ наблюдался при ингибировании

нитрификации [Jia, Conrad, 2009], что говорит о способности гетеротрофного роста некоторых почвенных АОА.

В настоящее время большое внимание отводится вопросу, в каких условиях доминирует окисление аммиака аммонийоокисляющими археями (АОА), а в каких аммонийоокисляющими бактериями (АОБ). Для окисления аммиака микроорганизмом *N. maritimus* (группа I.1.a в составе таумархеот) достаточно чрезвычайно низкого порога содержания субстрата (<10 нМ общего NH_4^+ и NH_3 , что составляет предел обнаружения используемого метода) и низких значений K_m (133 нМ), соответствующих олиготрофным условиям среды [Martens-Habbena et al., 2009]. Адаптация к низким концентрациям аммония также была показана для представителя термофильной таумархеотной группы I.1b *N. gargensis* [Hatzenpichler et al., 2008]. Для сравнения, минимальная концентрация аммония, необходимая для роста АОБ, превышает таковую для АОА на два порядка (>1мкМ для нейтральной pH) со значениями K_m от 46 до 1780 мкМ аммония [Martens-Habbena et al., 2009; Koper et al., 2010]. Измеренные значения K_m для почв колеблются от 2 до 42 мкМ аммония [Martens-Habbena et al., 2009; Koper et al., 2010], и поэтому данный процесс может быть связан как с АОА, так и с АОБ. В целом, активность почвенных АОА наблюдается, когда концентрация NH_4^+ -N ниже 15 мг/г почвы [Schleper, Nicol, 2010; Pratscher et al., 2011], в то время как для АОБ требуются более высокие концентрации (> 100 мкг NH_4^+ -N на г почвы) [Pratscher et al., 2011; Xia et al., 2011; Jia, Conrad, 2009]. Кроме того, форма используемого азота также может сыграть решающую роль: активность АОА наблюдается, когда азот представлен минерализованной органической формой, источником которого служат органические удобрения или органическое вещество почвы, тогда как АОБ доминируют при наличии аммония из минеральных удобрений [Schleper, Nicol, 2010].

На основе анализа генома *N. Maritimus* и *C. symbiosum*, а также исходя из того, что АОА не содержат гомолога бактериального гидроксилламин-

оксидоредуктазы, был предложен механизм окисления аммиака представителями АОА, который принципиально отличался от такового у АОБ. Так, аммиак окисляется не через гидроксилламин (NH_2OH), как у АОБ, а через нитроксил (HNO) в нитрит [Walker et al., 2010], в результате чего на окисление аммиака расходуется в два раза меньше молекул O_2 [Schleper, Nicol, 2010]. Более низкие потребности в кислороде подтверждают результаты, по которым АОА встречаются не только в полностью аэрированных почвах и богатых кислородом морских водах, но и в широком спектре местообитаний с пониженным содержанием кислорода [Schleper, Nicol, 2010; Erguder et al., 2009]. АОА можно найти в широком диапазоне рН, температуры, солености и концентрации фосфата; некоторые АОА приспособлены для сульфидных сред, что увеличивает потенциальный диапазон АОА ниш по множеству факторов окружающей среды [Schleper, Nicol, 2010, Erguder et al., 2009].

В основе распределения архей и бактерий по экологическим нишам лежат различия в их биохимических и генетических особенностях. Хотя археи широко распространены в умеренных экосистемах, их по-прежнему рассматривают как экстремофилов, адаптированных к обитанию в неблагоприятных условиях при высоких температурах, засоленных или ультракислых средах [Schleper et al., 2005]. Именно таумархеотные копии гена *amoA*, а не бактериальные, остаются относительно стабильными в градиенте засоленности, что говорит о высокой устойчивости АОА к засолению [Santoro et al., 2008]. Также АОА штаммы доминируют над АОБ в условиях дефицита кислорода [Park et al., 2010]. Как было уже показано выше, ключевое биохимическое преимущество архей над бактериями в неблагоприятных условиях заключается в составе архейных тетраэфирных мембран, обеспечивающих низкую проницаемость для ионов. Такая низко проницаемая мембрана помогает клеткам таумархеот сохранять внутриклеточный рН близкий к нейтральному, позволяя осуществлять окисление аммония в кислых средах.

Особая специфика таумархеот в механизме окисления аммония позволяет им осуществлять этот процесс при низких значениях pH [He et al., 2012], и обеспечивает экологическое преимущество АОА над АОБ в олиготрофных условиях (рис. 4). Еще одно экологическое преимущество АОА в кислых почвах может быть связано с высокой зависимостью их аммоний-окислительной и электрон-транспортной систем от ионов меди, поскольку в условиях кислых почв повышается доступность меди [Blainey et al., 2011; Hallam et al., 2006; Walker et al., 2010]. Наконец, 3-гидроксипропионат/4-гидроксипропионатный метаболический путь фиксации углерода у АОА более энергетически эффективен по сравнению с циклом Кальвина-Башама-Бенсона у бактерий [Walker et al., 2010]. Таким образом, АОА таумархеоты выигрывают конкуренцию у АОБ в условиях низких pH или дефицита аммония.

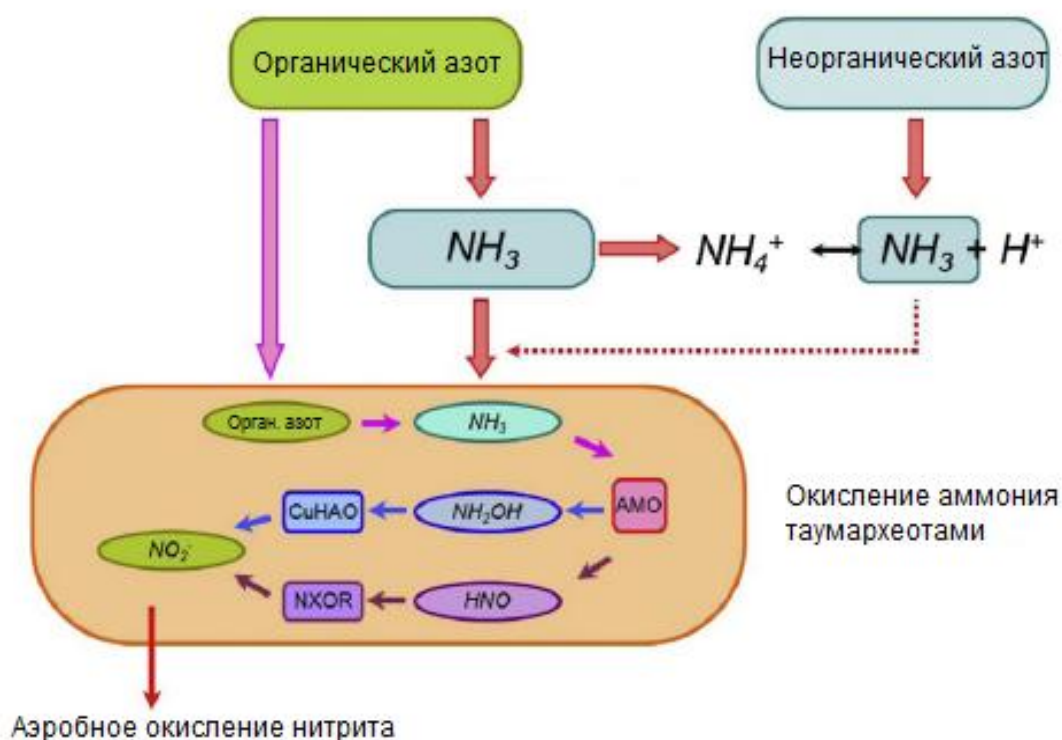


Рис. 4. Возможные источники аммония и пути окисления аммония таумархеотами на основе геномного анализа *N. maritimus* [Walker et al., 2010].

1.2.3. ЭВРИАРХЕОТЫ

Эвриархеоты (*Euryarchaeota*) представляют еще один филум в составе домена Archaea. Среди эвриархеот выделяют 8 классов: *Methanopyri*, *Methanococci*, *Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Archaeoglobi*, *Halobacteria*, *Thermococci* и *Thermoplasmata*. По физиологии эвриархеоты подразделяются на психрофилов, термофилов, мезофилов, галофилов и алкалофилов [Pesaro, Widmer, 2002; Poplawski et al., 2007]. Среди эвриархеот известны метаногены, метанотрофы, денитрификаторы, сульфатредукторы, Fe-окислители, а также органотрофы [Kletzin, 2007].

Филогенетический анализ более чем 8000 архейных последовательностей гена 16S рРНК показал, что эвриархеоты являются, вероятно, наиболее разнообразным филумом в составе архей [Schleper et al., 2005]. Тем не менее, до недавнего времени основные представления относительно экофизиологических характеристик эвриархеот были связаны преимущественно с изучением ограниченного числа культивируемых штаммов чистых культур, а также расшифровкой около 30 полных геномов, большинство которых генетически и физиологически довольно далеки от почвенных эвриархеот-мезофилов, в связи с чем генетические, физиологические и экологические особенности этой группы остаются наиболее плохо изученными [Barberan et al., 2011].

Развитие молекулярно-генетических подходов и связанное с этим изучение генов некультивируемых форм способствовало расширению представлений о распространении и генетическом разнообразии эвриархеот [Schleper et al., 2005]. Эвриархеоты найдены в морских [DeLong, 1992] и пресноводных [Auguet et al., 2010] водоемах, гиперсолевых отложениях [Hollister et al., 2010], рисовых почвах [Liesack et al., 2000], рубце крупного рогатого скота [Whitford et al., 2001] и в других местообитаниях. Изучение почвенных эвриархеот происходило в основном в почвах рисовников, поэтому потенциальные функции и разнообразие эвриархеот недооценивались. В связи с этим, распространение эвриархеот, как правило,

связывалось с условиями строгого анаэробноза, и лишь в редких работах упоминалось о распространении этой группы архей в хорошо аэрированных почвах лесных, луговых и сельскохозяйственных экосистем [Pesaro, Widmer, 2002; Poplawski et al., 2007].

Тем не менее, популяции метаногенов были успешно выращены во многих типах почв с высокой степенью аэрированности среды [Peters, Conrad 1995]. Метаногены выявлены в почвах лесных экосистем [Kuesel et al., 1999], а также в почве междурядий под картофелем [Gattinger et al., 2002a]. Некоторые "метаногенные" последовательности гена 16S рРНК эвриархеот были найдены в песчаной почве под посевом ячменя (табл. 1).

Таблица 1. Эвриархеотные последовательности гена 16S рРНК, обнаруживаемые в условиях почв умеренной зоны при доступе кислорода и отсутствии переувлажнения.

<i>Methanosarcinaceae, RC1</i>	Местоположение	Авторы
Обрабатываемая почва под ячменем	Уппсала, Швеция	Poplawski et al., 2007
<i>Marine group II</i>		
Сельскохозяйственные песчаные почвы	Берлин, Германия	Ruppel et al., 2007
<i>Thermoplasmatales</i>		
Верхние слои почвы под елово-буковым лесом	Унтеререндинген, Швейцария	Pesaro, Widmer, 2002
Почва под широколиственным лесом	Марбург, Германия	Kemnitz et al., 2007
Верхние горизонты	Новый Южный Уэльс, Австралия	Midgley et al., 2007

Последовательности гена 16S рРНК, принадлежащие *Thermoplasmatales*, были найдены в нескольких типах почв (табл. 1). Гены 16S рРНК, принадлежащие *Halobacterium salinarum*, были извлечены из лесных почв бореальной зоны [Jurgens et al., 1997]. Недавно было показано, что метаногены, рассматриваемые как строго облигатные анаэробные эвриархеоты, успешно функционируют в аэрированных горных почвах по всему миру [Angel et al., 2012]. При инкубировании этих почв в анаэробных

условиях моментально активизировалась эмиссия метана [Angel et al., 2012]. В других работах высокая численность эвриархеот в аэрированных горных почвах указывала, что наличие представителей филума *Euryarchaeota* не обязательно связано со строгим анаэробиезом, и эти микроорганизмы могут также существовать в почвах при аэробных условиях [Pesaro, Widmer, 2002; Bomberg, Timonen, 2007].

Микориза грибов может быть благоприятной средой для развития разных групп архей, в том числе таких представителей эвриархеот, как *Halobacterium* spp. [Bomberg, Timonen, 2007]. Четыре из пяти разных видов эктомикоризных грибов содержали устойчивые популяции этих микроорганизмов, причем эвриархеотные гены 16S рНК не были обнаружены в почве вне эктомикоризы [Bomberg, Timonen, 2007]. Эти эвриархеоты могут жить внутри эктомикоризных грибов, как, например, в случае распространенного эктомикоризного гриба *Laccaria bicolor* [Bertaux et al., 2003]. Эвриархеотные последовательности гена 16S рНК, принадлежащие представителям *Methanolobus*, были обнаружены в анаэробных участках с активным метаногенезом, сформированных эктомикоризой шотландской сосны [Bomberg et al., 2010]. Род *Methanolobus* относится к семейству *Methanosarcinales*, которое толерантно к кислороду, широко распространен в почвах рисовников, где происходит чередование аэробных и анаэробных зон [Orphan et al., 2001b]. *Methanomicrobiales*, родственный по отношению к *Methanosarcinales* таксон и также устойчивый к некоторой аэрации, был обнаружен во влажных болотах Шпицбергена, но не обнаруживался в почвах [Hoj et al., 2006]. Эвриархеоты-метаногены не были обнаружены в более сухих местообитаниях, что могло быть связано с малым количеством "горячих точек" (hotspots), в которых метаногены могли проявлять активность. Разнообразные последовательности гена 16S рНК эвриархеот-метаногенов были также найдены в почве, ризосфере и эктомикоризе шотландской сосны и белой березы, произрастающих в Финляндии [Bomberg, Timonen, 2007]. Таким образом, эктомикориза служит

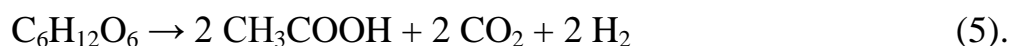
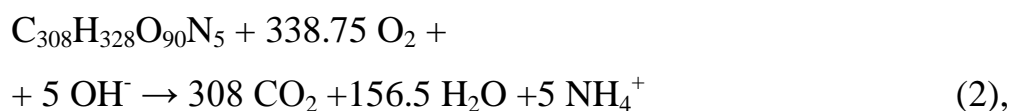
особой экологической нишей для эвриархеот-метаногенов, благодаря формированию участков с пониженной доступностью кислорода.

1.3. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ В ГЛОБАЛЬНЫХ ЦИКЛАХ УГЛЕРОДА И АЗОТА

Несмотря на небольшую биомассу, прокариоты составляют значительную долю микробного сообщества почвы и играют важную роль в глобальных циклах различных элементов. Кроме того, часть процессов, слагающих эти циклы, способны осуществлять исключительно прокариоты. Специфические функции в глобальных циклах углерода и азота свойственны не только бактериям, но и археям. Таумархеоты осуществляют процесс окисления аммония, эвриархеоты активно участвуют в продукции парниковых газов, прежде всего, метана, который является конечным продуктом при анаэробном разложении органических материалов. Считается, что 74% атмосферного метана имеет биологическое происхождение, эмиссия которого связана с деятельностью эвриархеот [Liu, Whitman, 2008]. Помимо метаногенеза, эвриархеоты оказались способны окислять метан [Michaelis et al., 2002], фиксировать азот [Raymond et al., 2004], восстанавливать нитраты [Cabello et al., 2004], а также трансформировать соединения железа и серы [Edwards et al., 2000].

Минерализация углерода. Энергия С-Н-связей и содержащиеся в органическом веществе химические элементы служат микроорганизмам источниками энергии и питания, обеспечивая рост и жизнедеятельность [Заварзин, Колотилова, 2001]. Основными продуктами минерализации органических веществ являются газообразные оксиды углерода, азота, серы, а также аммоний, нитраты, фосфаты и другие соединения. При восстановительных условиях среды главными продуктами минерализации выступают метан и сероводород. Чем доступнее микроорганизмам субстрат, тем активнее идет его разложение и минерализация, тем больше прирост биомассы, выше микробное дыхание и больше продуцируется С-СО₂.

Агентами «микробного дыхания» в почве выступают гетеротрофные микроорганизмы (бактерии, немикоризные и микоризные грибы, актиномицеты), простейшие и почвенная макрофауна (беспозвоночные, мелкие позвоночные животные). Вклад почвенной макрофауны в общее выделение CO_2 не превышает нескольких процентов [Wolters, 2000]. Растения являются главным автотрофным продуцентом диоксида углерода в ходе корневого дыхания. Вклад других автотрофов, например, водорослей и хемоавтотрофов, низок и проявляется лишь в специфических местообитаниях этих организмов. Как следствие, CO_2 в почве образуется за счет 1) микробного разложения органического вещества почвы в свободных от корней и растительных остатков зонах (базальное дыхание), 2) микробного разложения органического вещества почвы в смежных с корнями и растительными остатками зонах (ризосферный прайминг-эффект), 3) микробного разложения мертвых растительных остатков, 4) микробного разложения ризодепозитов живых корней (ризомикробальное дыхание), 5) дыхания корней [Кузуяков, 2006]. Образование диоксида углерода при разложении микроорганизмами глюкозы и сахаров, гуминовых кислот, щавелевой и лимонной кислот в аэробных условиях осуществляется в ходе реакций (1-5) [Dilly, 2001].



Чем выше эффективность усвоения микроорганизмами углерода, тем меньше его расходуется на дыхание и меньше теряется из почвы в виде CO_2 [Six et al., 2006]. Для почвенного сообщества установлены разные величины эффективности микробного роста: от 0.14 до 0.77 или в среднем 0.53 г $\text{C}_{\text{мик}}/\text{г}$ метаболизированного углерода. Считается, что грибы отличаются более

высокой эффективностью утилизации углерода субстрата, чем бактерии. Из этого следует, что на дыхание может расходоваться от 23 до 86% углерода субстрата.

Катаболическое разложение органических веществ хемоорганотрофами также приводит к образованию CO_2 в качестве конечного продукта (рис. 5).

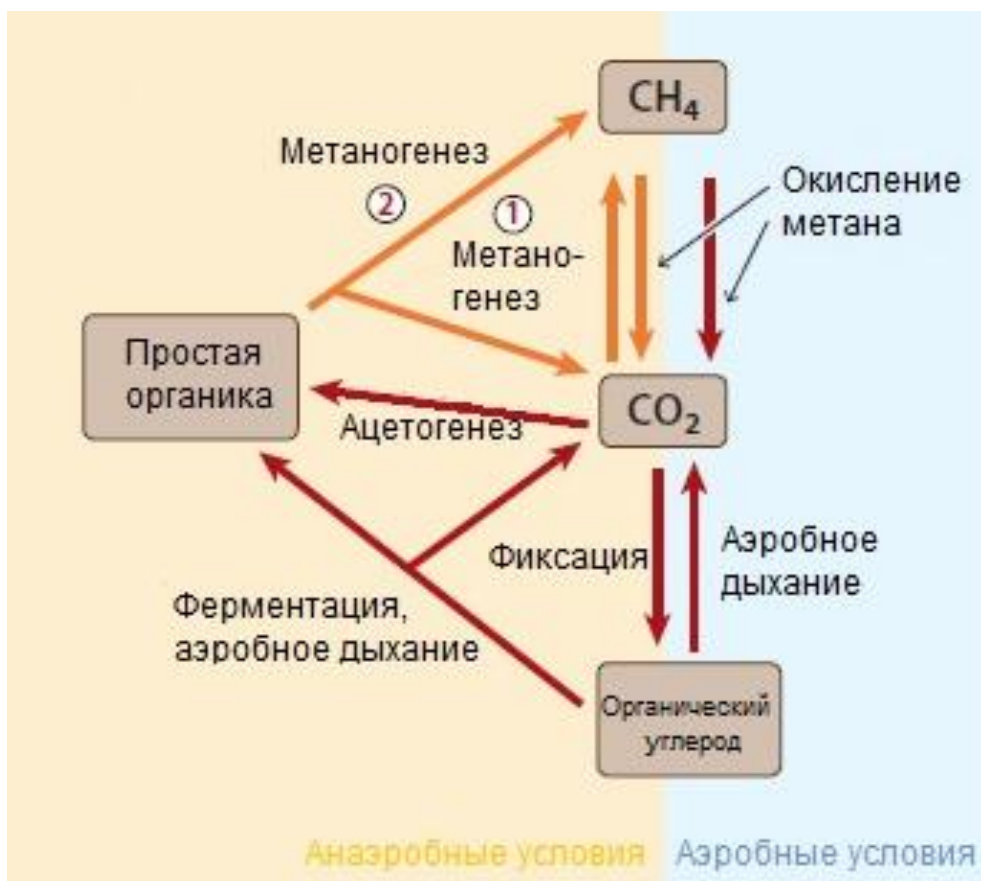


Рис. 5. Схема участия архей и бактерий в циклах углерода. Красными стрелками обозначены процессы, которые осуществляются как археями, так и бактериями; оранжевыми стрелками обозначены процессы, осуществляемые исключительно археями. Цифрами обозначены: 1 – водородотрофный метаногенез (литотрофный процесс, ведущий к восстановлению CO_2 при участии H_2 в качестве донора электрона); 2 – метилотрофный, формиатотрофный или ацетотрофный метаногенез (органотрофный процесс восстановления метилового спирта, муравьиной или уксусной кислот).

Тем не менее, отсутствие внешних акцепторов электронов (ферментативные условия) или ограничение в дыхательных возможностях приводит к выделению частично окисленных соединений, например, органических кислот и спиртов. Большое количество представителей архей,

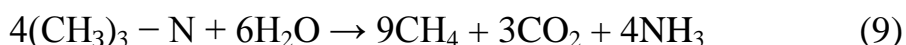
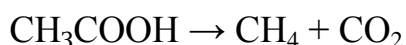
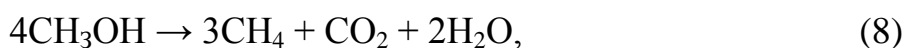
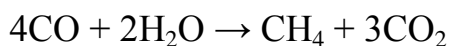
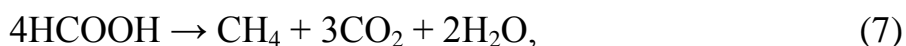
как аэробов, так и анаэробов, способны к органотрофному росту (например, метаногены и метаноокислители).

Ассимиляция углерода. Диоксид углерода, образующийся в почве при минерализации органических веществ, преимущественно выделяется в атмосферу, однако некоторая его часть подвергается биотической и абиотической фиксации. Основные абиотические механизмы внутрипочвенного связывания CO_2 – это растворение, сорбция, выпадение карбонатов, защемление в микропорах [Смагин, 2000]. Способностью ассимилировать CO_2 обладает широкий спектр анаэробных и аэробных гетеротрофных микроорганизмов, включая бактерии и грибы [Miltner et al., 2005; Šantrůčková et al., 2005]. В частности, аэробные виды *Rhodococcus* и *Xanthobacter* были способны накапливать биомассу, ассимилируя CO_2 . Наличие легкоразлагаемого органического материала, например уксусной кислоты, может стимулировать фиксацию CO_2 микроорганизмами. По одним оценкам, сезонные изменения интенсивности темновой фиксации CO_2 в сельскохозяйственной почве составляли от 0.2 до 4.8 мг/м²/ч и положительно коррелировали с почвенной температурой и выделением CO_2 [Shimmel, 1987]. В других исследованиях скорость фиксации CO_2 гетеротрофными микроорганизмами была того же порядка в почве при pH 4.8, составляя 2.8, и 36.5 мг/м²/ч – при pH 7.5 [Šantrůčková et al., 2005]. В микробной биомассе и во внеклеточных метаболитах обнаруживалось от 1.9 до 11.3% меченого углерода, утилизированного из CO_2 , при этом 98–99% фиксированного $\text{C-}^{14}\text{CO}_2$ находилось в виде метаболитов. Хемоавтотрофные бактерии, получающие энергию из неорганических субстратов с использованием как аэробных и анаэробных путей дыхания, широко распространены в большинстве типов почв. К активным потребителям диоксида углерода отнесены такие факультативные хемоавтотрофы, как, например, *Cupriavidus metallidurans*, *Rhodoferrax ferrieducens* и *Ralstonia eutropha* [Hart et al, 2013].

Большое количество культивируемых архей, представителей филумов *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*, способны к автотрофному

росту, ассимилируя углерод из неорганических соединений (CO_2 , HCO_3^-) путем их восстановления в простые органические молекулы (рис. 5). Представители архей способны также к миксотрофному росту двумя возможными вариантами: либо одновременно с восстановлением неорганических соединений дополнительно ассимилировать простые органические соединения при благоприятных условиях, либо переключаться между автотрофным и гетеротрофным метаболизмом [Kletzin, 2007].

Продукция метана. Метаногенез представляет собой анаэробный процесс образования метана путем восстановления диоксида углерода либо органических соединений с низкой молекулярной массой. Метаногены составляют конечное звено анаэробной пищевой цепи, используя как основной акцептор электронов CO_2 и восстанавливая его до метана, способны метаболизировать ацетат, расщепляя его на метан и CO_2 , или разлагать метиламины и метилсульфиды в бескислородных сульфатсодержащих средах (6-9):

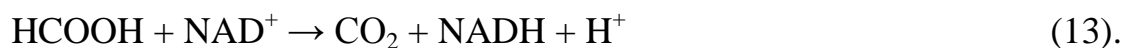
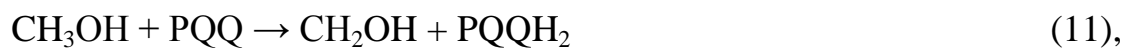
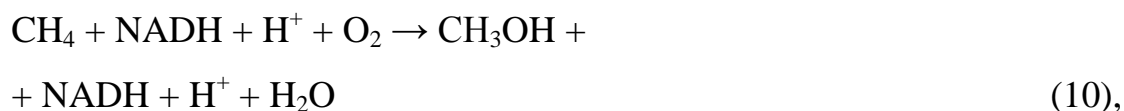


Метаногенез является уникальным процессом, осуществлять который способны лишь представители домена Archaea (рис. 5). Метаногены – строгие анаэробы, хемоавтотрофы или хемогетеротрофы, продуктом катаболизма которых является метан. Все эвриархеоты-метаногены входят в состав пяти классов: *Methanopyri*, *Methanococci*, *Methanobacteria*, *Methanomicrobia* и *Thermoplasmata* [Dridi et al., 2012; Liu, Whitman, 2008; Paul et al., 2012]. В природных средах метаногенные микроорганизмы способны развиваться синергично и синхронно с другими анаэробными бактериями. Основными субстратами метаногенов являются H_2+CO_2 , ацетат, формиат,

метилованные соединения (алканы, метиламины, диметилсульфаты), первичные и вторичные спирты, на основании чего различают несколько трофических групп метаногенов [Conrad, 1996]: водородотрофные, формиатотрофные, ацетотрофные и метилотрофные метаногены [Ferry, 2010; Liu, Whitman, 2008]. В то время как большинство культивируемых метаногенов осуществляют реакцию с использованием диоксида углерода и водорода, представители семейства *Methanosarcinales* способны продуцировать метан с помощью реакции ферментации ацетата и диспропорционирования метилированных субстратов. Недавно открытые метаногенные *Thermoplasmata* осуществляют восстановление метанола [Dridi et al., 2012; Paul et al., 2012] и также способны использовать метиламины [Poulsen et al., 2013]. Несмотря на то, что ферментация ацетата проводится лишь небольшой группой культивируемых метаногенов, считается, что ацетотрофия ответственна за две трети продукции CH_4 . Источником азота служит аммиак, хотя некоторые штаммы могут также использовать аминокислоты или фиксировать азот, источником серы – сульфид или молекулярная сера.

Устойчивое образование CH_4 происходит при окислительно-восстановительном потенциале меньше -100 мВ. Диффузия кислорода к метаногенным микроразонам – ключевой фактор метаногенеза [Conrad, 2005]. Выживание метаногенов в аэробных условиях почв можно объяснить: 1) наличием не выделенных еще метаногенов, мало чувствительных к присутствию O_2 ; 2) возникновением анаэробных микроразонов после увлажнения внутри макроагрегатов в нижних переуплотненных слоях, в пищеварительном тракте мезофауны, в консорциях с потребляющими кислород микроорганизмами [Манучарова и др., 2001; Conrad, 1996].

Окисление метана. Микроорганизмы, способные использовать метан в качестве источника углерода и энергии, называются метанотрофами [Гальченко, 2001]. Первичные реакции превращения метана метанотрофами последовательно протекают через следующие стадии (10-13):



Имеется несколько гипотез ферментативного образования метанола из метана. По одной из них, метан окисляется по монооксигеназному механизму: один атом кислорода окисляет метан до метанола, второй восстанавливается до воды. На этом основании фермент, катализирующий окисление метана, назван метанмонооксигеназой. Радиоизотопные эксперименты с серой лесной почвой показали, что основным продуктом бактериального окисления метана был диоксид углерода – в него переходило 60% ^{14}C - CH_4 , независимо от того, была это почва из под леса или с пахотного участка [Кравченко и др., 2005]. В других исследованиях с таежной почвой окислялось до CO_2 60% поглощенного CH_4 [Whalen et al., 1992], а в трех лесных почвах 35–39% поглощенного из атмосферы метана ассимилировалось в микробную биомассу [Holmes et al., 1999].

Согласно клеточной физиологии, метанооксиляющие микроорганизмы подразделяются на метанассимилирующие бактерии (метанотрофы) и на бактерии с соокислением метана (автотрофные аммонийоксиляющие бактерии) [Гальченко, 2001; Conrad, 1996; Hanson, Hanson, 1996; Holmes et al., 1999]. По функциональным характеристикам различают 2 группы метанотрофов (тип I и тип II) и 2 группы аммонийоксиляющих бактерий (b- и g-подгруппы). Метанотрофы типа I (роды *Methylobacter* и *Methylomonas*) принадлежат к γ -подгруппе *Proteobacteria* и используют рибулозомонофосфатный путь ассимиляции формальдегида. Метанотрофы типа II (роды *Methylosinus* и *Methylocystis*) принадлежат к α -подгруппе и используют сериновый путь. К третьему типу (X-тип) часто относят род *Methylococcus capsulatus* (γ -подгруппа), обладающий отдельными

характеристиками двух других типов. Метанотрофы II- и X-типа способны фиксировать молекулярный азот. Активность метанмонооксигеназы зависит от наличия O_2 и восстановленных эквивалентов. Мембраносвязанная метанмонооксигеназа, эволюционно близкая ферменту аммониймонооксигеназе нитрифицирующих бактерий, синтезируется в присутствии значительной концентрации меди и имеется в наличии у всех метанотрофов. Растворимая метанмонооксигеназа была обнаружена только у метанотрофов типов II и X. Предполагается, что за поглощение атмосферного метана ответственна еще неизвестная группа метанотрофных бактерий, с характеристиками метанотрофов, подобных типу II. Анализ генов монооксигеназы, выделенной из почв, свидетельствует о принадлежности этой неизвестной группы бактерий к субклассу класса *Proteobacteria* [Holmes et al., 1999].

В почвах обнаружены 2 формы окисления CH_4 [Hanson, Hanson, 1996; Le Mer, Roger, 2001]. Окисление с «высоким сродством» имеет место при концентрациях CH_4 , близких к концентрации его в атмосфере. Эта форма наиболее распространена в почвах и осуществляется метанотрофами типа I. Окисление метана метанотрофами типа II с «низким сродством» развивается в метаногенных средах с высокой концентрацией метана и низким содержанием кислорода, а также в почвах с $pH > 4.4$. Популяции бактерий, ответственные за окисление метана с низким сродством, являются истинными метанотрофами. Измерения скорости окисления CH_4 в почвах подтвердили возможность ассимиляции CH_4 и прирост биомассы даже при низких атмосферных концентрациях CH_4 . Биомасса метанотрофных бактерий в лесной почве при ее инкубации с содержанием метана в атмосфере 2 ppm составляла около 7.2×10^6 кл./г сухой почвы. Среди метанооксиляющих бактерий высокого сродства доминировал род *Methylocella palustris*, подобный метанотрофам типа II. Метанотрофы с высоким сродством зачастую тесно связаны с метанотрофами низкого сродства типа II [Maxfield et al., 2006].

Доминирующий вид метанотрофных бактерий в серой лесной почве под лесом (*Methylocystis parvus*) составлял 94% от суммарной численности идентифицированных метанотрофов, тогда как в почве агроценоза его численность составляла менее 6% [Кравченко и др., 2005]. Напротив, численность *Methylobacter vinelandii* в почве леса была ниже предела детекции, тогда как в пахотной почве он доминировал (57.1% от суммарной численности метанотрофов). Метанооксиляющее сообщество серой лесной почвы лесного биоценоза было достаточно унифицированным и представлено только видами *Methylocystis* (II группа метанотрофов). Сообщество пахотной почвы было более разнообразным – в его составе были идентифицированы не только представители рода *Methylocystis*, но и двух родов метанотрофов типа I (*Methylomonas* и *Methylobacter*).

Несмотря на то, что археи ответственны за эмиссию метана из почвы, некоторые архейные группы также способны проводить обратный процесс окисления CH_4 до CO_2 (рис. 5). Метанооксиляющие (метанотрофные) археи, в отличие от метанотрофных бактерий – строгие анаэробы, получающие энергию путем совмещения процесса окисления метана и восстановления сульфатов [Thauer, 2011; Thauer, Shima, 2008]. Метанотрофные археи принадлежат к филуму *Euryarchaeota* – *Methanomicrobia*. Представители архей-метанотрофов до сих пор не получены в виде чистых культур, поэтому их таксономия официально не утверждена. Поскольку метанотрофные археи часто встречались в микробном консорциуме с сульфатредуцирующими *Deltaproteobacteria* [Knittel, Voetius, 2009], долгое время считалось, что сульфат-зависимое анаэробное окисление метана – синтрофный процесс. Тем не менее, недавние исследования показали, что архей-метанотрофы осуществляют окисление метана вместе с диссимиляционной сульфатредукцией автономно от бактерий [Milucka et al., 2012; Offre et al., 2013].

Почвенные метанотрофы чаще находятся в состоянии покоя, чем в состоянии максимальной активности. Инкубирование почв при высоких

концентрациях CH_4 вызывает повышение метанотрофной активности. Поэтому самая высокая метанотрофная активность была обнаружена при ярко выраженных метаногенных условиях [Kammann et al., 2009]. Одновременный подсчет количества обоих видов популяций в ряде почв подтвердил, что метаногены и метанотрофы присутствуют в почвах одновременно [Le Mer, Roger, 2001; Dalal et al., 2008]. Известные метанотрофы типа I и II преобладают в нейтральных природных средах, предпочтительно с высокой концентрацией CH_4 , при этом представители типа II способны перестраиваться на кинетику высокого сродства [Henckel et al., 2000].

Фиксация азота. Биологическая фиксация атмосферного азота микроорганизмами – основной природный источник поступления азота в наземные экосистемы. В прошлом, азотфиксация связывалась с ризобияльным и актиноризальным симбиозом, деятельностью свободноживущих и симбиотических цианобактерий, а также свободноживущих и симбиотических (ассоциативных) гетеротрофных бактерий. Использование молекулярно-биологических и метагеномных методов исследований, показало наличие потенциальной способности к азотфиксации у чрезвычайно широкого круга микроорганизмов, включая археи и ранее неизвестные бактерии, позволив объяснить ранее выполненные и современные оценки размеров поступления атмосферного азота в почву [Vitousek et al., 2013]. Генеральный путь биологической азотфиксации отображается следующим уравнением [De Bruijn, 2015]:



Процесс азотфиксации связан с гидролизом 16 эквивалентов АТФ и сопровождается образованием одной молекулы H_2 . У свободноживущих diaзотрофов образующийся при участии нитрогеназы аммиак ассимилируется в глутамат по глутаминсинтетазному (глутаматсинтазному) пути. В случае симбиотической или ассоциативной фиксации бактерии выделяют образующийся аммиак, который ассимилируется с помощью

растительных ферментов. Ферментативная конверсия молекулярного азота в аммиак катализируется нитрогеназой, ферментным комплексом присущим свободноживущим и симбиотическим diaзотрофам. Нитрогеназа состоит из двух металлопротеинов: молибдоферредоксина (Mo-Fe-протеин) – тетрамера состоящего из неидентичных субъединиц α и β , и редуктазного компонента (Fe-протеин) – димера, состоящего из идентичных субъединиц. Синтез нитрогеназы кодируется *nif* генами. Полный комплект нитрогеназы требует нескольких *nif* генов, включая *nifD* и *nifK* для Mo-протеиновых субъединиц и *nifH* для Fe-протеина, а также других генов (*nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifY*, *nifS*, *nifU*, *nifW* и *nifZ*) [Franché et al., 2009]. Азотфиксирующие *nif* гены свойственны большинству филумов в составе доменов Bacteria и Archaea (рис. 6).

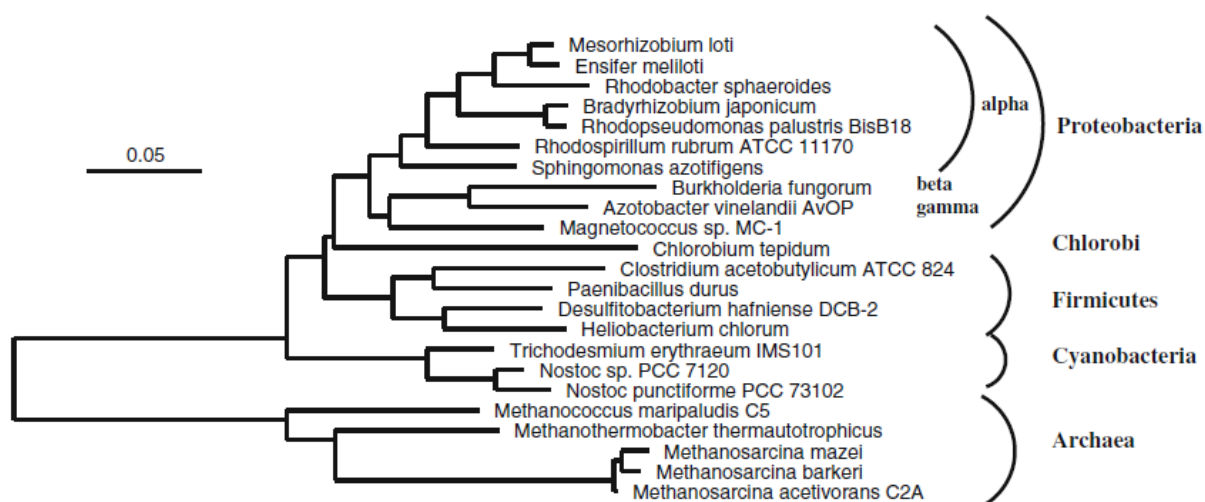


Рис. 6. Филогенетическая структура прокариот, несущих *nif* гены [Franché et al., 2009].

Из 1002 вида архей и бактерий с полностью секвенированными геномами, 174 вида содержали последовательности, подобные *nifH*, а также последовательности, подобные *nifD* [Dos Santos et al., 2012]. Более половины из этих видов (92 из 174) ранее считались неспособными к азотфиксации. Следовательно, филогенетическое распределение diaзотрофов в действительности шире, чем допускалось ранее. До работы, выполненной этими

авторами, бактерии-дiazотрофы были найдены в шести таксономических филумах: *Actinobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. В ходе исследований к шести уже известным филумам было добавлено семь новых филумов: *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chrysiogenetes*, *Deferribacteres*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*. В отличие от бактерий, азотфиксирующей способностью у архей обладал филум *Euryarchaeota*, для которого было определено семь видов потенциальных diaзотрофов.

Дiazотрофия распространена среди метаногенных и метанооксиляющих архей (рис. 5), но осуществляется лишь при отсутствии иных источников азота, также как и в случае с азотфиксирующими бактериями [Cabello et al., 2004; Dekas et al., 2009; Leigh, 2000]. Diazотрофные метаногены принадлежат к трем классам: *Methanobacteria*, *Methanococci* и *Methanomicrobia*, которые были изолированы из различных экологических сред, где присутствовали анаэробные условия [Cabello et al., 2004; Leigh, 2000; Mehta, Vaross, 2006].

Нитрификация. Аммоний, потребляемый микроорганизмами, не только ассимилируется в биомассе, но и подвергается окислению в нитрат при аэробных условиях через нитрификацию (рис. 7). До недавнего времени считалось, что данный процесс может осуществляться лишь литотрофными, в меньшей степени, гетеротрофными микроорганизмами [Умаров и др., 2007; Offre et al., 2013]. Классическими представителями нитрифицирующих бактерий являются *Nitrosomonas europaea* и *Nitrobacter winogradskyi*, последовательно окисляющие аммоний до гидроксиламина, нитрита и нитрата. Источником углерода для автотрофных нитрификаторов служит диоксид углерода. Реакции окисления катализируются аммониймонооксигеназой, гидроксиламиноксиредуктазой и нитритоксидоредуктазой. Промежуточные продукты окисления аммония до нитратов – химически нестойкие, и их накопление в почве в случае нарушения нитрификационного процесса сопровождается образованием закиси азота. В почвах с высокой метанотрофной способностью окисление

аммония осуществляется метанотрофными бактериями (метанотрофная нитрификация) с образованием закиси азота [Mandernack et al., 2000]. Агентом метанотрофной нитрификации выступают метанотрофные бактерии типа II.

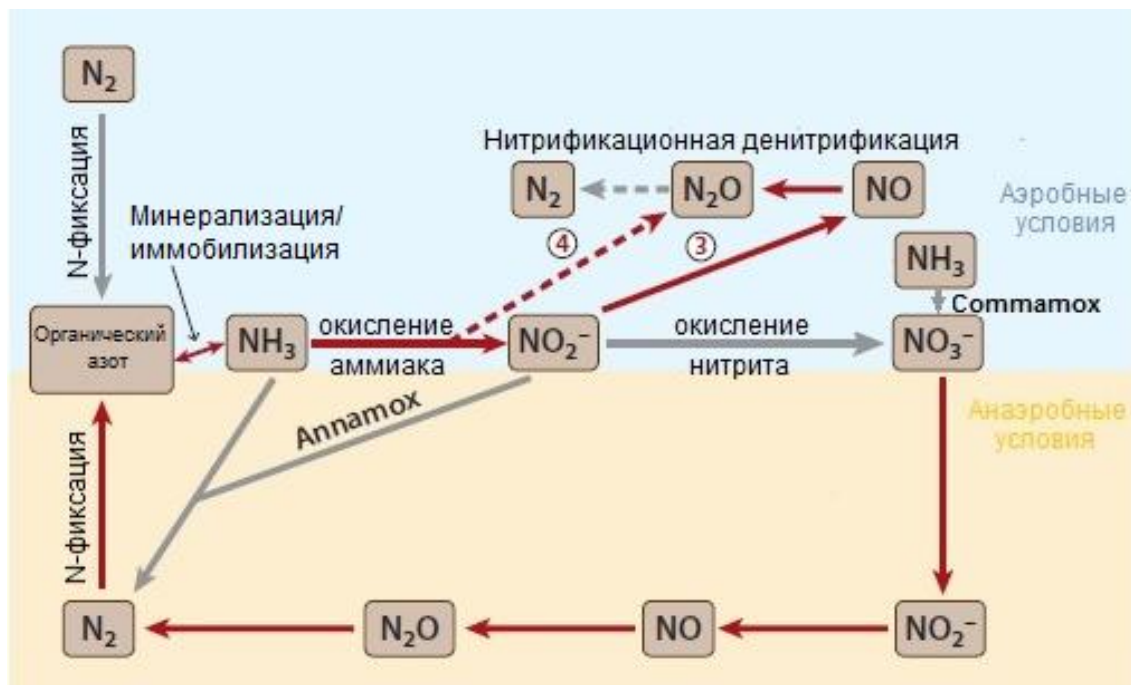


Рис. 7. Схематическое изображение участия архей и бактерий в глобальном цикле азота. Красными стрелками обозначены процессы, которые осуществляются как археями, так и бактериями; серыми стрелками указаны процессы, которые осуществляют только бактерии. Цифрами обозначены: 3 – нитрификационная денитрификация, протекаемая в условиях низких концентраций кислорода; 4 – N_2O может быть побочным продуктом при окислении аммония.

В отличие от автотрофных нитрификаторов, которые используют энергию, получаемую при окислении NH_4^+ на фиксацию CO_2 , большая группа гетеротрофных микроорганизмов способна окислять соединения азота, используя углерод органического вещества в качестве источника питания и энергии. Гетеротрофная нитрификация наиболее часто свойственна микроскопическим грибам. Хотя субстраты, промежуточные и конечные продукты гетеротрофной и автотрофной нитрификации одни и те же, ферменты этих двух процессов отличаются друг от друга [Wrage et al., 2001]. Автотрофные и гетеротрофные микроорганизмы могут окислять N-

NH_4^+ как автономно, так и в ассоциации друг с другом. Многие денитрифицирующие микроорганизмы являются гетеротрофными нитрификаторами, а некоторые способны одновременно осуществлять гетеротрофную нитрификацию и аэробную денитрификацию, а также окислять метан [Умаров и др., 2007].

Открытие литотрофных архей, успешно развивающихся в кислых средах умеренной зоны и способных окислять NH_4^+ в NO_2^- [Könneke et al., 2005; Treusch et al., 2005] привело к полному пересмотру роли микроорганизмов в цикле азота. Исследования аммонийокисляющих архей (АОА) показали их значительный вклад в глобальный цикл азота [Leininger et al., 2006], а филогенетический анализ на основе r-белков, коровых генов и сравнительной геномики позволил выделить АОА, ранее считавшихся мезофильными кренархеотами, в новый филум – *Thaumarchaeota* [Brochier-Armanet et al., 2008, 2011; Pester et al., 2011). Уровень pH почв является ключевым фактором состава аммонийокисляющего почвенного микробного сообщества: в ультракислых и кислых почвах, для которых характерна низкая доступность аммония, доминируют АОА, в нейтральных и щелочных – АОВ [Gubry-Rangin et al., 2011; Fischer et al., 2013].

Денитрификация. Денитрификации является формой анаэробного дыхания, при котором NO_3^- или NO_2^- выступают акцепторами электронов, с последовательным образованием газообразных соединений азота: оксида азота (NO), закиси азота (N_2O), и / или молекулярного азота (N_2) (рис. 7). Молекулярный азот является также конечным продуктом анаэробного окисления бактериями NH_4^+ , называемого анаммоксом [Kartal et al., 2012]. Денитрификационный путь превращения азота осуществляются представителями разных таксономических групп микроорганизмов (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Propionibacterium* и др.), относящихся преимущественно к гетеротрофам и факультативным анаэробам [Умаров и др., 2007]. Денитрификаторами могут быть различные бактерии, некоторые археи, и даже эукариоты [Cabello et al., 2004; Zumft, 1997].

Из-за гетерогенности состава почвы процессы нитрификации и денитрификации могут протекать одновременно (coupled nitrification-denitrification): нитрит и нитрат, продуцируемые нитрификаторами в аэробных микроразонах почвы, утилизируются денитрификаторами, развивающимися в анаэробных микроразонах [Wrage et al., 2001]. Подобные ассоциации характерны между верхними хорошо аэрированными и нижними слабо аэрированными слоями почвы, внешними и внутренними частями агрегатов.

Особый путь продукции закиси азота – это процесс «нитрификационной денитрификации» (nitrifier denitrification) осуществляемой аммонийоксилирующими бактериями, в ходе которого окисление NH_4^+ до NO_2^- сменяется восстановлением NO_2^- до N_2O и N_2 [Wrage et al., 2001; Shaw et al., 2006]. Главное отличие нитрификационной денитрификации от одновременной нитрификации-денитрификации, описанной выше, состоит в том, что нитрификационная денитрификация осуществляется одной группой аммонийоксилирующих микроорганизмов. Если нитрификаторы лишь вовлечены, наряду с денитрификаторами, в одновременную нитрификацию-денитрификацию, то при нитрификационной денитрификации нитрификаторы сами выполняют и окисление, и восстановление азотистых соединений. Такой способностью, по-видимому, обладают *Nitrosomonas europaea* и *Nitrospira spp* [Shaw et al., 2006].

Наличие денитрификационного метаболизма у архей и биохимический смысл архейной денитрификации практически не изучены [Offre et al., 2013]. Считается, что лишь немногие культивируемые археи способны осуществлять денитрификацию. Все пока известные археи-денитрификаторы относятся либо к органотрофным галофилам или к литоавтотрофным (факультативным или облигатным) гипертермофилам, использующим NO_3^- в качестве акцептора электронов. Исключением является *Pyrobaculum aerophilum*, который адаптирован к NO_3^- и NO_2^- [Völkl et al., 1993]. Археи-денитрификаторы продуцируют различные смеси NO_2^- , NO , N_2O и N_2 . На

основании метагеномного анализа было предположено, что некультивируемая архея «*Ca. C. subterraneum*» также может использовать NO_3^- в качестве акцептора электронов [Nunoura et al., 2011].

Аммонийоокисляющая таумархеота «*Candidatus Nitrosopumilus Maritimus*» и обогащенные таумархеотами культуры, полученные из океанических вод, показывали способность продуцировать закись азота [Löscher et al., 2012; Santoro et al., 2011], а сравнение изотопного состава N_2O с таковой в океанических водах дало основание считать АОА одним из главных океанических продуцентов этого парникового газа [Santoro et al., 2011]. В условиях почвенной среды роль аммонийоокисляющих бактерий в продукции закиси азота в течение нитрификации и денитрификации, по-видимому, более выражена, по сравнению с АОА, как это следовало из результатов исследований изотопного соотношения N_2O , выделяющегося из почвы, и определения числа копий генов, относящихся к нитрификации и денитрификации [Xia et al., 2011].

Таким образом, археи выполняют специфические функции в биогеохимических циклах углерода и азота, обеспечивая трансформацию их соединений в неблагоприятных для бактерий и экстремальных по условиям средах. Если участие архей в нитрификации является общепризнанным фактом, то механизмы и условия поддержания денитрификации и азотфиксации археями требует дополнительных подтверждений.

1.4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ И АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Современная почвенная микробиология располагает широким спектром методов выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов, определения численности, состава, структуры и активности почвенного микробного сообщества, позволяющих оценить биоразнообразие почвенных экосистем, установить биогеоценотические и общебиосферные функции микроорганизмов, выделить или изолировать

определенные штаммы в биотехнологических целях [Методы почвенной..., 1991]. Наряду с прямыми методами определения микробной биомассы [Полянская, Звягинцев, 2005], имеется несколько косвенных способов ее измерения в почве. Наиболее известными и распространенными являются методы субстрат-индуцированного дыхания, фумигации-инкубации, фумигации-экстракции, регидратации-инкубации, регидратации-экстракции, измерения содержания АТФ, жирных кислот и ДНК [Благодатский и др., 1987; Anderson, Domsch, 1978; Jenkinson, Powlson, 1976; Joergensen, Mueller, 1996; Martens, 1995; Nannipieri et al, 2003].

1.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ И ОБЩЕЙ ЧИСЛЕННОСТИ ПРОКАРИОТ В ПОЧВЕ

Определение микробной биомассы. Основным методом прямого определения микробной биомассы является подсчет численности грибного и бактериального компонентов микробного сообщества с использованием люминесцентной микроскопии [Методы почвенной..., 1991]. Главным преимуществом прямого люминесцентного микроскопирования является возможность дифференцировать мицелий грибов и актиномицетов, определять длину мицелия, осуществлять подсчет численности бактерий и грибных спор [Кожевин, 1989; Полянская и др., 1995 а, б, в; Полянская, Звягинцев, 2005]. К недостаткам этого метода можно отнести ненадежность дифференциации клеток на живые и мертвые, вероятность учета почвенных частиц за микроорганизмы, условности выбора коэффициентов пересчета числа клеток на биомассу [Мирчинк, Паников, 1985; Domsch et al., 1979]. Методу прямой микроскопии свойственна преувеличение численности и биомассы грибов в почве. Получаемые результаты зависят от индивидуального мастерства исполнителя, из-за чего возникают трудности при сравнении результатов, получаемых разными исследователями [Domsch et al., 1979; Stahl et al., 1995].

Метод субстрат-индуцированного дыхания (СИД) основан на измерении начальной скорости дыхания микроорганизмов после обогащения почвы дополнительным источником углерода в виде глюкозы (Anderson, Domsch, 1978). Предполагается, что большинство почвенных микроорганизмов быстро реагируют на добавление глюкозы, и что дыхание отражает ответ всей микробной биомассы. При температуре, равной $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$, выделение 1 мл CO_2 в час соответствует 40 мг $\text{C}_{\text{мб}}$ почв. Микробная биомасса почвы определяется путем пересчета скорости субстрат-индуцированного дыхания по формуле: $\text{C}_{\text{мб}}$ ($\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ почвы) = ($\text{мкл CO}_2 \cdot \text{г}^{-1}$ почвы/час) $\cdot 40.04 + 0.37$.

Оригинальный метод фумигации-инкубации (ФИ) основан на биоцидной обработке почвы путем фумигации [Jenkinson, Powlson, 1976]. Углерод отмершей биомассы становится субстратом для новой генерации микроорганизмов, прирост которой оценивается по дополнительному продуцированию C-CO_2 . Согласно одной из модификаций [Wardle et al., 1993], субобразцы почвы фумигируются хлороформом с последующей инокуляцией почвой исходного образца (соотношение фумигированной и нефумигированной почвы 9:1) и инкубируются в течение 10 дней при 22°C в 500 мл колбах с поглощением CO_2 20 мл 1н. NaOH. Общий CO_2 , выделившийся в течение 10 дней, титруется 0.5н. HCl. При подсчете $\text{C}_{\text{мб}}$ используется пересчетный коэффициент $K_c=0.41$ (K_c – фракция углерода микробной биомассы, минерализованной до C-CO_2 в течение 10 дней).

Метод фумигации-экстракции (ФЭ) – второй по распространенности после СИД способ измерения углерода микробной биомассы [Brookes et al., 1985; Vance et al., 1987]. По методу ФЭ также производится биоцидная обработка половины почвенных образцов (неспиртосодержащими хлороформом или трихлорметаном), остальные образцы остаются в ненарушенном состоянии. Далее обе партии образцов экстрагируют K_2SO_4 . Разница между экстрагируемыми количествами $\text{C}_{\text{орг}}$ умножается на

пересчетный коэффициент K_s , устанавливаемый эмпирическим путем [Brookes et al., 1985].

Для методов СИД, ФИ и ФЭ характерна высокая чувствительность к состоянию образцов, способу их хранения. В связи с повреждением клеточных стенок микроорганизмов в результате замораживания-оттаивания или высушивания-увлажнения, точность обоих методов зависит от длительности и условий хранения образцов почвы. Не допускаются периодические перепады температуры и влажности. В целом, проблема подбора оптимального метода определения микробной биомассы для работы с замороженными или высушенными образцами остается актуальной.

Применение методов СИД и ФИ ограничено не только состоянием образцов и условиями их хранения. Несмотря на то, что субстрат-индуцированное дыхание может быть оценено по поглощению кислорода [Beck et al., 1997; Scheu, 1992], стандартный и более чувствительный вариант метода основан на измерении потока CO_2 . Применимость такого варианта СИД ограничена рН почвы [Lindsay, 1979] в связи с высокой растворимостью CO_2 в щелочных почвах [Blagodatskaya, Kuzyakov, 2008; Oren, Steinberger, 2008]. Для учета поглощения CO_2 в щелочных условиях были предложены различные корректирующие коэффициенты [Oren, Steinberger, 2008; Sparling, West, 1990], которые связывают измеренные значения выделившегося CO_2 с теоретически рассчитанным количеством адсорбировавшимся CO_2 в растворе. Подобный расчет основан на теоретическом распределении CO_2 между газовой и жидкой фазами [Oren, Steinberger, 2008]. В целом, процедура определения корректирующих коэффициентов для CO_2 в щелочных почвах является довольно сложной и времязатратной, причем эффективность этих коэффициентов остается неочевидной (Oren, Steinberger, 2008). Наконец, обмен между растворимым HCO_3^- и карбонатами, содержащимися в почвах при рН выше 6.5 [Kuzyakov et al., 2006], также ведет к непрогнозируемому недоучету микробной биомассы в щелочных почвах. Воспроизводимость результатов ФЭ в значительной степени

определяется присутствием корней и корневых остатков, количество которых может сильно варьировать в зависимости от типа землепользования, глубины, типа растительности, и специфики подготовки образца, например просеивания [Mueller et al., 1992]. Таким образом, методы СИД, ФИ и ФЭ, считающиеся стандартными, в действительности имеют много ограничений, давая порой несопоставимые величины содержания микробной биомассы в почве.

Количественное определение микробной двухцепочечной ДНК (дцДНК) может служить альтернативным вариантом определения почвенной микробной биомассы при наличии условий, ограничивающих применение СИД или ФЭ. В отличие от методов, основанных на определении не прямых показателей (например, дыхание), ДНК-метод позволяет оценивать микробную биомассу, измеряя непосредственное количество базового клеточного компонента, универсального для всех живых организмов. Для количественного определения дцДНК применяется флуоресцентный краситель пикогрин (PicoGreen) [Fornasier et al., 2014; Terrat et al., 2012]. Пикогрин селективно связывается с двухцепочечной ДНК, увеличивая интенсивность флуоресценции более чем в 1000 раз, пропорционально концентрации ДНК. В связи со своей высокой селективностью, пикогрин может быть использован для количественного определения тотальной почвенной дцДНК даже в присутствии различных примесей – гуминовых веществ, остатков клеточных стенок и прочих растворимых органических [Bachoon et al., 2001]. В ряде исследований получены близкие значения пересчетного коэффициента (F_{DNA}) из мкг дцДНК (г почвы)⁻¹ в мкг СИД- $C_{мик}$ (г почвы)⁻¹: 5.0 [Anderson, Martens, 2013], 5.4 [Blagodatskaya et al., 2003] и 5.6 [Lloyd-Jones, Hunter, 2001]. Усредненный по нескольким работам корректирующий коэффициент F_{DNA} равен 6, означая, что примерно 16% $C_{мик}$ составляет ДНК микроорганизмов [Joergensen, Emmerling, 2006]. Увеличение количества ДНК пропорционально микробному росту [Anderson, Martens,

2013], свидетельствует о правомочности использования этого параметра в качестве критерия величины микробной биомассы.

Количественное определение ДНК может быть использовано с целью оценки изменений в структуре микробных сообществ, например, после внесения в почву углеродных субстратов [Nannipieri et al., 2003], а также при определении различных эко-физиологических индексов, метаболических коэффициентов и показателей активности [Blagodatskaya et al., 2003; 2014]. Еще одним преимуществом ДНК-метода является незначительное влияние на результат измерения растительной дцДНК, доля которой в общей экстрагируемой из почвы дцДНК составляет малую величину, в отличие от значимого влияния корневых остатков при определении микробной биомассы методом ФЭ. Для большого ряда почв было показано, что доля растительной дцДНК не превышала 2.6% от общей дцДНК во всех образцах [Gangneux et al., 2011]. Наконец, определение микробной биомассы по количественному содержанию дцДНК возможно для замороженных почвенных образцов, поскольку замораживание почвы является одной из процедур, используемых при экстракции ДНК [Smalla et al., 1993; 2008]. Замораживание-оттаивание повышает выход ДНК из лизированных клеток [Tsai, Olson, 1991].

В настоящее время существует большое количество различных китов (наборов), которые широко используются для экстракции ДНК из почв. Тем не менее, далеко не каждый кит может быть применен для количественного выделения почвенной ДНК [Sagar et al., 2014]. Многие киты ставят перед собой цель добиться максимальной чистоты образцов ДНК, которая необходима при дальнейшем использовании этих проб для молекулярно-биологических анализов. Как следствие, такие киты включают в себя множество дополнительных этапов очистки, которые приводят к значительным потерям ДНК. Поэтому, выбор оптимального кита является необходимым условием для успешного количественного выделения ДНК из почвы.

Оценка численности бактерий, архей и грибов по количеству гена 16S рРНК. Количественная ПЦР (полимеразная цепная реакция, обеспечивающая значительное увеличение малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновых кислот в биологическом материале) в реальном времени является одним из основных методов, используемых при исследовании микробных сообществ [Kabir et al., 2003; Kolb et al., 2003; Okano et al., 2004; Stubner, 2002]. Принцип метода количественной ПЦР (кПЦР) основан на детекции выбранной информативной молекулы, флуоресценция которой увеличивается по мере накопления продукта во время очередного цикла амплификации [Raeymaekers, 2000]. Амплификация гена 16S рРНК позволяет количественно оценивать численность грибов, архей и бактерий на разных таксономических уровнях, в том числе и некультивируемые формы [Fierer et al., 2005]. С помощью кПЦР установлено доминирование в почвах представителей *Proteobacteria*, а также значительное распространение филумов *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [Fierer et al., 2005]. Метод кПЦР применим для определения численности архей в почвах, доминирующим филумом которых чаще всего является мезофильная группа *Crenarchaeota* [Kemnitz et al., 2007], относящаяся теперь к филуму *Thaumarchaeota*.

Существенным недостатком метода кПЦР в почвенной микробиологии является то, что получаемые численности и доли разных групп почвенных микроорганизмов могут не соответствовать их реальной представленности в почвенных образцах [Fierer et al., 2003]. Сдвиг в численности отдельных групп микроорганизмов может быть вызван спецификой процедуры экстракции ДНК из почв [Martin-Laurent et al., 2001], в результате которой ДНК представителей каких-то филумов может не попасть в изолят. Еще одной причиной служит гетерогенность в количестве рибосомальных оперонов [Tourova, 2003]: множественные копии рибосомальных генов могут приходиться на один организм. Наконец, во время кПЦР часть рРНК генов

отдельных филогенетических групп может не амплифицироваться в результате кПЦР [Fierer et al., 2005].

1.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ АРХЕЙ И БАКТЕРИЙ

Определение функциональных генов. При изучении почвенных микробных сообществ помимо количественной оценки генов 16S рРНК, существует возможность определения других генов, в том числе функциональных, т.е. ответственных за тот или иной процесс. Примерами функциональных генов являются гены *nifH* (азотфиксация), *amoA* (нитрификация), *mcrA* (метаногенез), *pmoA* (метанотрофия), *dsrAB* (диссимиляционная сульфатредукция).

Амплификация гена *amoA* архей и бактерий с помощью количественной ПЦР для определения и сравнения численности АОА и АОБ показало, что количество архейного гена *amoA* было в десятки-сотни раз больше бактериального [Leininger et al., 2006]. Преобладание архейного гена *amoA* было продемонстрировано для почв с разными системами обработки в диапазоне рН от 3.7 до 6 [He et al., 2007], от 4.9 до 7.5 [Nicol et al., 2008] и от 8.3 до 8.7 [Shen et al., 2008]. Преобладание архейного гена *amoA* над бактериальным интерпретируется как доказательство большей роли архей в нитрификации по сравнению с бактериями [Leininger et al., 2006; Nicol et al., 2008].

Однако при интерпретации активности процесса окисления аммония по численности генов возникают сложности, поскольку высокая численность функционального гена не означает, что процесс, кодируемый данным геном, активен [Prosser, Nicol, 2008]. Экспрессия гена может протекать лишь при довольно узком интервале сочетаний экологических условий, а продукт гена может выполнять другие функции, альтернативные окислению аммония (Prosser, Nicol, 2008). Как следствие, оценка роли архей и бактерий в

окислении аммония должна проводиться путем сопряженных измерений количества гена *amoA* и активности нитрификации [He et al., 2007; Nicol et al., 2008; Shen et al., 2008].

Использование гена 16S рРНК для детекции и идентификации метаногенных и метанотрофных архей в сложных микробных сообществах часто бывает затруднено, поскольку обе эти физиологические группы не являются монофилетичными [Knittel, Voetius, 2009]. ПЦР-анализ компонентов ДНК, специфичных для метаногенов, служит альтернативой гену 16S рРНК при изучении архей, синтезирующих метан [Lueders et al., 2001]. Подобным компонентом является терминальный метаногенный ферментный комплекс – метил коэнзим-М редуктаза (MCR), который катализирует восстановление метильной группы, связанной с коэнзимом-М, с сопутствующим выделением метана. Данный ферментный комплекс считается уникальным и, в то же время, обязательным компонентом метаногенов, что позволяет использовать его для их специфической детекции. При этом уникальность *mcrA* гена для метаногенов поставлена под сомнение, поскольку данный ген был найден в анаэробных метаноокисляющих археях [Hallam et al., 2003].

MCR оперон представлен двумя формами – MCRI and MCRII. MCRI-форма предположительно присутствует во всех метаногенах, в то же время MCRII-форма найдена лишь у представителей порядков *Methanobacteriales* и *Methanococcales*. Пептид MCRI комплекса, кодируемый *mcrA* геном, был выбран для детекции метаногенов с помощью ПЦР [Hales et al., 2006]. Полученные многими результаты, подтвердили эффективность использования данного функционального и филогенетического маркера для оценки разнообразия и распространения метаногенов, в том числе в почвах [Hallam et al., 2003; Kravchenko et al., 2015; Luton et al., 2002; Lueders et al., 2001].

Таким образом, ПЦР-анализ микробных генов является эффективным инструментом изучения почвенным микробных сообществ, особенно в

комбинации с технологиями секвенирования нового поколения, но, как и другие методы, имеет свои недостатки и ограничения, связанные, в том числе, с проблемой корректности праймеров и реакции амплификации, а также присутствия внеклеточной ДНК. Наконец, как уже упоминалось выше, присутствие функционального гена в почве не всегда связано с конкретной экосистемной функцией.

Детекция, визуализация и количественный подсчет метаболически активных клеток архей и бактерий методом FISH. Современные методы, основанные на полимеразной цепной реакции, позволяют осуществлять быструю и чувствительную детекцию почвенных микроорганизмов вне зависимости от возможности или невозможности культивирования, однако эти методы не дают информации о численности реальных клеток и их пространственного распределения в почве [Amann et al., 2001]. В связи с этим, использование микроскопии в почвенной микробиологии по-прежнему остается важным исследовательским инструментом. Метод *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными пробами (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) совмещает возможности идентификации, визуализации, а также определения численности отдельных филогенетических и функциональных групп архей и бактерий в различных природных субстратах, в том числе в почвах [Amann et al., 1995; Amann, Ludwig, 2000; Daims et al., 1999; Eickhorst, Tippkötter, 2008; Schmidt, Eickhorst, 2014]. Данный метод позволяет количественно определять живые метаболически активные клетки почвенного микробного сообщества [Манучарова, 2008; Манучарова и др., 2011; Ярославцев и др., 2011] благодаря использованию молекулярных проб, способных к гибридизации исключительно с комплементарной последовательностью нуклеотидов рРНК, наличие которой в клетках свидетельствует об их росте и способности к делению [Molin, Givskov, 1999]. Дизайн молекулярных проб осуществляется с помощью анализа нуклеотидных последовательностей участка 16S рРНК из баз данных и последующего подбора необходимой олигонуклеотидной

последовательности с помощью программного обеспечения, например ARB [Amann, Ludwig, 2000]. Пробы могут быть подобраны для любых таксономических уровней, от целых доменов до индивидуальных видов [Amann et al., 2001].

Процедура метода включает в себя 1) десорбцию клеток от почвенных частиц, 2) фиксацию клеток, 3) нанесение фиксированного образца на поверхность предметного стекла, 4) гибридизацию со специфичными пробами, и 5) микрофотографирование. Для гибридизации используют набор рРНК-специфичных олигонуклеотидных проб длиной в 15-30 нуклеотидов, ковалентно связанных 5'-концом с флуоресцирующей молекулой. Стандартными флуорофорами служат флуоресцин, тетраметилпродамин, Техасский красный [Southwick et al., 1990]. В настоящее время для метода FISH наиболее часто используются карбоцианины Cy-3, Cy-5 и Cy-7 (фикоэритрины) [Amann, Ludwig, 2000; Eickhorst, Tippkotter, 2008; Schmidt, Eickhorst, 2014].

Метод FISH с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами оказался эффективным при подсчете количества метаболически активных клеток в почвах разных экосистем – от пустынных до болотных [Dedysh et al., 2001; 2006; Манучарова, 2008; Манучарова и др., 2011; Ярославцев и др., 2011]. Кроме того, метод FISH и его модификации эффективно дополняет данные других молекулярно-биологических методов [Dedysh et al., 2001; 2006], позволяет детектировать и количественно оценивать численность микроорганизмов в зависимости от осуществляемых ими процессов, например, метаногенов [Nakamura et al., 2006; Kubota et al., 2006; 2008; Schmidt, Eickhorst, 2014] и метанотрофов [Dedysh et al., 2001; Schmidt, Eickhorst, 2014], выявлять влияние ксенобиотиков на микробные сообщества почв [Caracciolo et al., 2010].

Визуализация клеток и возможность изучения пространственного распределения метаболически активных клеток архей и бактерий в почвах – главные преимущества данного метода. Совмещение метода FISH и

микрopedологических подходов, сохраняющих ненарушенной почвенную структуру, позволяет выявлять локализацию микроорганизмов в почвенных образцах, по которой можно говорить о закономерностях пространственного расположения микробного сообщества в зависимости от распределения влаги, органического вещества в микрoзонах [Eickhorst, Tippkötter, 2008]. Помимо почвы, данный метод позволяет изучать расположение микроорганизмов в других специфических экологических локациях, например, в ризосфере и ризоплане [Schmidt, Eickhorst, 2013; 2014]. Наконец, метод FISH является чувствительным и информативным при изучении симбиотических систем микроорганизмов, ассоциированных друг с другом, растениями, грибами или животными [Pirtila et al., 2000; Lübeck et al. 2000; Manz et al., 2000].

В настоящее время на основе флуоресценции *in situ* гибридизации возникают различные модификации, позволяющие повышать чувствительность данного метода, либо использовать его в комбинации с другими подходами. Модификация CARD-FISH (catalysed reporter deposition) основана на гибридизации клеточной рРНК с олигонуклеотидными пробами, мечеными ферментом пероксидазой хрена, а также молекул тирамида, используемые для амплификации флуоресцентного сигнала [Pernthaler et al., 2002]. Накопление флуоресцентных молекул в месте гибридизации значительно повышает чувствительность FISH по сравнению с обычными пробами, позволяя лучше детектировать микроорганизмы [Amann et al., 2001; Eickhorst, Tippkötter, 2008; Schmidt et al., 2012; Teira et al., 2004]. Ещё одна разновидность метода – RING-FISH – основана на применении множественно меченных полинуклеотидных проб, которые организуются в большие сети вокруг целевой последовательности [Logue et al., 2008]. Модификация Gold-FISH представляет собой комбинацию эпифлуоресценции и сканирующей электронной микроскопии, являясь эффективным и эффективным методом для изучения пространственного распределения микробных сообществ почв [Schmidt et al., 2012].

К недостаткам методов, основанных на флюоресценции *in situ* гибридизации, можно отнести уменьшение чувствительности при малом содержании рРНК в клетках, проблему проницаемости клеточных стенок бактерий для олигонуклеотидных проб, не соответствующую 100%-ной эффективность гибридизации проб с рРНК [Kubota, 2013]. Кроме того, FISH - микроскопия требует продолжительного времени, не позволяя охватить большое количество образцов [Glöckner et al., 1999].

Определение полярных липидов мембран бактерий и архей. Анализ фосфолипидов жирных кислот (PLFA) является одним из методов оценки структуры микробных сообществ. Метод PLFA детектировал изменения в структуре микробных сообществ, вызванных влиянием смены землепользования [Zelles et al., 1992, 1995], загрязнения [Frostegard et al., 1993] и общим снижением качества почвы [Bardgett et al., 1996; Bossio et al., 1998; Reichardt et al., 1997]. Поскольку фосфолипиды присутствуют во всех живых клетках, они являются эффективными молекулами-биомаркерами. У микроорганизмов фосфолипиды содержатся исключительно в клеточных мембранах. При гибели клетки клеточные мембраны подвергаются быстрой деградации, входящие в их состав фосфолипиды жирных кислот метаболизируются, в связи с чем фосфолипиды могут быть использованы для количественной оценки живой микробной биомассы, а также для описания микробных сообществ в таких комплексных местообитаниях, как почва [Hill et al., 2000; Zelles, 1999].

Для состава полярных липидов мембран архей характерна глубокая химическая обособленность по сравнению с бактериями и эукариотами. Фосфолипиды жирных кислот не входят в состав сложных липидов архей, поэтому не могут служить биомаркером сообществ почвенных архей [Gattinger et al., 2002b]. Вместо PLFA у архей роль полярным липидов отведена фосфолипидам эфирных липидов (phospholipid etherlipids – PLEL), состоящих из ди- и тетраэфиров глицерина (археолов и калдархеолов, соответственно), или из более комплексных полиолов с боковой цепью,

состоящей из C15, C20, C25 или C40-изопреноидов [Mansuco et al., 1985; Kates, 1993]. Полярные липиды мембран представителей *Euryarchaeota* состоят из археолов (дизэфирных липидов) с разной степенью гидроксирования и длиной боковых цепей изопреноидов, а также из калдархеолов (тетраэфирные липиды) с одним или двумя циклопентановыми кольцами. Представители *Crenarchaeota* и мезофильной группы *Thaumarchaeota*, в свою очередь, имеют калдархеолы, имеющие в своем составе от трех до восьми циклопептановых колец [Kates, 1993].

Таким образом, все современные молекулярно-биологические методы имеют свои определенные преимущества и ограничения, а использование каждого из них позволяет раскрыть специфические стороны состава, структуры и функционирования микробного сообщества.

Исследование структуры и разнообразия прокариотного компонента микробного сообщества почв методом высокопроизводительного секвенирования. Продолжительное применение секвенирования гена 16S рРНК по методу Сэнгера показало, что разрешающая способность этого метода не позволяет с необходимой точностью описывать и сравнивать микробные сообщества в сложных природных системах [Curtis et al., 2006]. Появление серийного анализа меток рибосомных последовательностей [SARST] [Kysela et al., 2005; Neufeld et al., 2004; Yu et al., 2006] и 454-пиросеквенирования, способных анализировать тысячи сиквенсов из сложных природных образцов, существенно увеличило производительность и глубину секвенирования [Anderson et al., 2008; Hamady et al., 2008; Lauber et al. 2009]. Данные анализы позволили по-новому взглянуть на состав и структуру микробных сообществ, получить доступ к информации о редких и малочисленных группах микроорганизмов [Huber et al., 2007; Neufeld, Mohn, 2005; Sogin et al., 2006]. Развитие технологий на основе платформы Illumina дало возможность генерировать массивы данных огромного размера [Caporaso, et al. 2011; Gloor et al. 2010], превосходя на

порядок 454-пиросеквенирование в количестве сиквенсов на единицу затрат [Shendure, Hanlee, 2008].

Технологии высокопроизводительного секвенирования широко используются для изучения состава и разнообразия микробных сообществ различных почв, биогеографии почвенных микроорганизмов, влияния различных почвенно-экологических факторов и землепользования [Acosta-Martínez et al., 2008; Hirsch et al., 2009; Jangid et al., 2008; Jones et al., 2009; Lauber et al., 2009; Osborn et al., 2000]. Установлено, что доминирующими почвенными таксонами являются *Acidobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* и *Bacteroidetes* [Eilers et al., 2011; Will et al., 2010]. Структура и состав микробных сообществ видоизменяются по глубине почвенного профиля. Было продемонстрировано, что с глубиной существенно снижается численность представителей филума *Bacteroidetes*. В то же время, для бактерий филума *Verrucomicrobia* характерен пик численности в диапазоне глубин 10 и 50 см [Eilers et al., 2011]. Сравнение результатов секвенирования тотальной почвенной ДНК, экстрагированной из горизонтов А и В, показало, что численность, разнообразие и состав микробных сообществ является горизонт-специфичными. Кроме того, микробное разнообразие в горизонте А выше по сравнению с горизонте В, а данный показатель положительно коррелирует с содержанием общего органического углерода, азота, и соотношением C:N [Will et al., 2010]. Изменения pH почвы отражаются, прежде всего, на распространении представителей домена *Acidobacteria*, в меньшей степени на *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, однако можно говорить о существенных достоверных изменениях в составе микробных сообществ всех основных таксонов в зависимости от реакции среды [Lauber et al., 2009].

1.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Археи долгое время рассматривались как исключительно экстремофильные организмы, не играющие особой роли в наземных экосистемах. Однако исследования последних двух десятилетий выявили важные и зачастую уникальные экологические и биогеохимические функции представителей этого домена. Доказано широкое метаболическое разнообразие архей и повсеместное их распространение в почвах. Общепризнана роль архей в глобальных биогеохимических циклах углерода, азота и серы. Известные два типа метаболизма, играющие важную роль в цикле биофильных элементов, осуществляются исключительно археями: метаногенез и анаэробное окисление метана в присутствии сульфата. Третьим специфическим типом архейного метаболизма, имеющим глобальное значение, является аэробное окисление аммония. Широкое распространение аммонийоокисляющих архей практически во всех аэробных местообитаниях, в том числе в почвах, указывает на значимость этих организмов в поддержании процесса нитрификации, наряду с бактериями. Поскольку в почвах археи тесно сопряжены с бактериями и могут являться конкурирующими между собой экологическими группами, изучение распространения архей без сопутствующей оценки бактериальных сообществ представляется неполным. Необходимо уточнение как метаболических и экологических различий между археями и бактериями, так и вклада архей и бактерий в биогеохимию и экологию почв. Первоочередное значение имеет следующий круг вопросов. Какова численность и биомасса архей в почвах и каков их вклад по отношению к бактериям? Как отражается изменение физико-химических свойств и экологических показателей в пределах почвенного профиля и при разных агрогенных воздействиях на биомассу и численность архей, а также на их конкурентные отношения с бактериями за экологические ниши? Какова реальная активность архей в почвах?

Поскольку подавляющее большинство архей и бактерий в почвах представляют собой некультивируемые формы микроорганизмов, решение

поставленных вопросов не может быть осуществлено без современных молекулярно-генетических подходов и методов, позволяющих учитывать и исследовать все микробное сообщество в целом, в том числе и некультивируемую его часть. Родовой и видовой состав, а также относительная численность отдельных таксонов почвенных архей и бактерий могут быть определены с помощью метода высокопроизводительного секвенирования последовательностей гена 16S рРНК из образцов тотальной почвенной ДНК. Общая численность архей и бактерий может быть определена по количеству копий гена 16S рРНК методом количественного ПЦР в реальном времени. Численность метаболически активных клеток архей и бактерий может быть детектирована с использованием флуоресценции *in situ* гибридизации (метода FISH) с использованием специфических олигонуклеотидных проб, связывающих с комплиментарными участками РНК, находящихся внутри клеток. В свою очередь, численность активных клеток может быть пересчитана в биомассу, и, таким образом, возможна оценка доли активного сообщества архей в прокариотную, так и в общую микробную биомассу. Наконец, определение потоков диоксида углерода, метана и закиси азота, может позволить связать численность метаболически активных клеток архей и бактерий с внутрпочвенными процессами углеродно-азотных взаимодействий.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились с двумя группами объектов. Первая группа включала в себя серую лесную и аллювиально-луговую почвы, образующих катену в пределах склонового ландшафта западной экспозиции правой части бассейна реки Любожиха, правого притока реки Ока (Московская область, Серпуховский район, г. Пущино). Вторую группу составляли типичный чернозем (Воронежская область, Таловский район, НИИ сельского хозяйства центрально-черноземной полосы им. В.В. Докучаева) и бурая полупустынная почва естественных и сельскохозяйственных экосистем (Астраханская область, Черноярский район, Прикаспийский НИИ аридного земледелия).

2.1.1. ПРИРОДНЫЕ УСЛОВИЯ ЮЖНОГО ПОДМОСКОВЬЯ

Правобережье реки Ока района исследований относится к Заокской физико-географической провинции (ФГП), занимающей северные отроги Среднерусской возвышенности на границе двух природных зон: таежно-лесной и лесостепной [Анненская и др., 1997]. Территория Заокской ФГП дренируется правыми притоками р. Ока. Заокское Подмосковье резко отличается от всей остальной части Московской области. Здесь близко от поверхности залегают каменноугольные известняки, местами перекрытые остатками неразмывтых юрских и меловых пород. В низовьях всех оврагов, прорезающих высокий берег Оки, известняки выходят на поверхность, образуя на их днищах ступени из каменных плит. Лессовидные суглинки содержат примеси карбонатных пород.

Климат юга Московской области умеренно-континентальный, отчетливо сезонный, определяется влиянием переноса воздушных масс атлантических, реже средиземноморских циклонов, выноса арктического воздуха с севера и трансформацией воздушных масс разного происхождения. Влияние арктических холодных масс сказывается в виде сильных

похолоданий в зимние месяцы и в виде «возврата холодов» в весенне-летний период, при которых происходит понижение температуры вплоть до заморозков на почве. По данным Серпуховской метеостанции среднегодовая температура воздуха составляет +5.2 °С. Самый холодный месяц в году январь, среднее значение его температуры -6.7°С. Самый теплый месяц-июль со средними температурами +18.0°. С. Средняя продолжительность теплого периода со среднесуточной температурой выше 0°С – 216 дней в году.

Средняя многолетняя сумма осадков составляет около 550-570 мм. За теплый период выпадает основное - до 70% - количество осадков. Наибольшее количество осадков бывает в июле. Периодически случаются сильные засухи. Высота снежного покрова на открытых пространствах в среднем составляет 38 см. Сроки образования устойчивого снежного покрова, так же как и сроки его появления и схода, из года в год сильно колеблются в зависимости от характера погоды. Почвы промерзают на 65-75 см и глубже. В последние два десятка лет число случаев промерзания почвы уменьшилось.

В окрестностях г. Пущино преобладают дуб черешчатый, лип сердцевидная, клен остролистный, вяз гладкий, вяз шершавый, ясень с примесью или без примеси ели [Алексеев и др., 1992]. Во втором ярусе обычны яблоня лесная, рябина обыкновенная, клен равнинный. Подлесок состоит из лещины обыкновенной, бересклета бородавчатого, жимолости обыкновенной, калины обыкновенной, а в более влажных местах черемухи обыкновенной. На почвах надлуговых террас Оки распространены сосняки и ельники кисличные и брусничные сложные. Травянистый покров представлен такими видами, как осока волокнистая, осока лесная, мятлик дубравный, зеленчук желтый, сныть обыкновенная, ветреница лютиковая, пролесник многолетний, медуница неясная, колокольчик широколистный, копытень европейский, ландыш майский.

По характеру почвенного покрова северная лесостепь включается в Среднерусскую провинцию лесной зоны серых лесных почв [Алифанов,

1995]. Разделение серых лесных почв на подтипы производится по морфологическим особенностям горизонтов, содержанию и составу гумуса, степени текстурной дифференциации профиля [Урусевская и др., 2000]. Соответственно выделяют три подтипа: светло-серые, серые и темно-серые лесные почвы. В окрестностях г. Пушкино распространены собственно серые лесные почвы, приуроченные к пологим склонам водораздельных пространств. Серые лесные почвы имеют профиль: A1—A1A2(A2B)—Bt—BtC(BtCca)—C [Единый государственный реестр..., 2014]. Окраска верхнего почвенного горизонта серая или светло-серая, структура мелкокомковая, непрочная, распыленная, гранулометрический состав – среднесуглинистый или тяжелосуглинистый [Урусевская и др., 2000]. Верхний почвенный горизонт на склонах как правило маломощный из-за эрозии. Переход в следующий горизонт хорошо заметен. На глубине 25-40 см окраска горизонта становится темно-коричневой, структура ореховатой. Присыпка кремнекислоты присутствует в виде пятен. Сложение плотное. В пределах этого горизонта нередко встречается второй гумусовый горизонт с характерной более темной окраской и повышенным содержанием органического углерода. Для горизонта, располагающего на глубине 40–96 см, характерна бурая окраска с коричневыми пятнами, на фоне которой в верхней части видна присыпка кремнекислоты в виде затеков по трещинам.

Почвообразующие породы разнообразные: карбонатные и бескарбонатные лессовидные суглинки и глины, моренные суглинки и глины. Цвет суглинков чаще всего палевый с пятнами и разводами светло-охристого цвета. Водный режим периодически промывного, а местами промывного типа. Уровень залегания грунтовых вод глубже 8-12 м.

В пойменных частях рек бассейна Оки широко развиты аллювиально-луговые пойменные почвы, образовавшиеся из речных наносов. Для пойменных почв характерен следующий профиль: A1—B1—Bg—CDg [Единый государственный реестр..., 2014]. Гумусовый горизонт A1 темно-серый или буровато-серый тяжелосуглинистого гранулометрического состава

со значительным количеством «остаточного», привнесенного с аллювием, гумуса мощностью от 30 до 50 см. В верхней части горизонта вычленяется плотная (3–6 см) дернина. Имеет зернистую структуру с ржаво-бурыми пятнами и прожилками. В1 — переходный горизонт с пятнами оглеения и ожелезнения, связанными с водородными процессами. Вg — глеевый горизонт голубовато-сизых тонов, степень оглеения сильно варьирует, часто имеет слоистое сложение. CDg — слоистый аллювий, обычно сильно оглеен, с прослойками погребенного торфа. Формируются в центральной пойме под лугово-болотной растительностью и ивняками. Почвообразующими породами для них служат слоистые и неяснослоистые аллювиальные отложения в основном суглинистого и глинистого механического состава. Эти почвы формируются в условиях периодического затопления паводковыми водами, а также под влиянием грунтовых вод, которые длительное время находятся в пределах почвенного профиля. Для этих почв характерны процессы водородной аккумуляции железа и процессы оглеения.

2.1.2. ПРИРОДНЫЕ УСЛОВИЯ И ПОЧВЫ В КАМЕННОЙ СТЕПИ

Каменная степь размещается на юго-востоке Воронежской области на Битюжско-Хоперском междуречье [Чевердин, 2013]. Общий уклон поверхности в северном направлении определяется ее местоположением в переходной полосе от Калачской возвышенности к Окско-Донской низменности. Территория Каменной Степи представляет собой слабоволнистую равнину с пологими балками и неоформленными степными западинами. Встречаются ветвистые овраги, местами глубоко врезаемые в толщу подпочвенных пород. На плоских недренированных участках встречаются многочисленные «блюдца», западинки, бугорки.

Климат Каменной степи — типично степной, умеренно-континентальный, с относительно холодной зимой и жарким, нередко засушливым летом. Средняя температура года +5.4 °С. По

гидротермическому коэффициенту, равному 1, территория относится к засушливой антициклонической области умеренного пояса переходной зоны от лесостепи к степи. Засухи случаются в среднем один раз в три – четыре года [Чевердин, 2013]. Средняя температура января минус 9.4 °С, февраля – минус 9.7 °С. Самый теплый месяц – июль со средней температурой воздуха +20.1 °С. Вегетационный период составляет 188 дней. Средние даты начала и конца вегетации приходятся на 13 апреля и 23 октября. В зимнее время бывают оттепели. Почва зимой промерзает в среднем на глубину до 60 см.

Каменная степь располагается в зоне недостаточного увлажнения. Атмосферные осадки выпадают неравномерно, как в течение года, так и в разные годы. Среднегодовое количество осадков составляет около 420-440 мм. До 75% их количества выпадает в теплое время года. Устойчивый снежный покров сохраняется около 100 дней. Средняя высота его в поле – 15-20 см, в лесополосах – иногда более метра. Грунтовые воды Каменной степи залегают в трех водоносных горизонтах: в четвертичных отложениях на глубине 2.5-10 м в слое покровных и валунных глин, в нижнетретичных породах на глубине 15-19 м и в меловой толще на глубине 64-65 м от высшей точки водораздела. На формирование ландшафтных комплексов Каменной степи большое влияние оказывают верховодки.

Территория Каменной степи характеризуется высокой распаханностью с наличием культурной растительности и лесных полос. Основными породами деревьев в лесных полосах являются: дуб черешчатый, тополь белый, береза бородавчатая, ясень, клен и другие породы. Из кустарниковых пород встречаются: акация желтая, бузина черная, жимолость лесная, боярышник. Травянистый состав в лесных полосах крайне беден. На заповедных участках присутствует ковыль перистый, вейник наземный, душица обыкновенная, клевер, чина луговая, мышиный горошек, молочай, пижма, шалфей и другие виды [Камышев, Хмелев, 1976]. В агрофитоценозах распространены озимая пшеница, рожь, ячмень, овес, горох, просо, гречиха, кукуруза, сахарная свекла, подсолнечник, многолетние травы.

Почвообразующими породами на территория Каменной степи являются глины и покровные суглинки. Почвенный покров в Каменной степи представлен сложными комбинациями из типичных, обыкновенных и выщелоченных черноземов, лугово-черноземных и черноземно-луговых почв разной степени выщелоченности в сочетании с осолоделыми и солонцевато-засоленными почвами западин, ложбин и склонов, а также аллювиально-делювиальными почвами [Зборищук и др., 2007; Хитров, Лойко, 2010]. Преобладают легкоглинистые, тяжелосуглинистые и среднесуглинистые, среднегумусные и малогумусные, среднемощные и маломощные черноземы с преимущественно нейтральным, слабокислым и близким к нейтральному рН. Черноземам типичным свойственен следующий профиль: А1—А1Вса—Вса—ВСа—Са. Прогумусированный слой подразделяется на два горизонта: А1 — темно-серый или черный, зернистый или комковато-зернистый и А1Вса, отличающийся побурением окраски и укрупнением структуры. Черноземы обыкновенные имеют профиль: А1—А1Вса—Вса—ВСа—Са—Сs. Распространены на дренированных плакорах и пологих склонах при уровне залегания грунтовых вод ниже 6 м. Черноземы выщелоченные приурочены к различного рода микропонижениям на водораздельных плато, мелким широким ложбинам, среди лесных полос, в которых складываются условия для повышенного увлажнения. Лугово-черноземные глинистые почвы расположены в слабо пониженных частях водораздела при уровне залегания грунтовых вод 3-5 м. По верховьям ложин отмечены черноземно-луговые почвы с уровнем грунтовых вод менее 3 м.

2.1.3. ПОЧВЕННО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ АРИДНОЙ ЗОНЫ СЕВЕРНОГО ПРИКАСПИЯ

Черноярский район (место расположения Прикаспийского НИИ аридного земледелия) расположен в северной части Астраханской области (около 48° с.ш.). Район с севера граничит с Волгоградской областью, с запада

- с республикой Калмыкия, с востока и с юга – с Ахтубинским и Енотаевским районами Астраханской области. Часть территории района расположена в пойме реки Волги. Территория района расположена в зоне полупустынь и сухих степей. Климат района рассматривается как сухой полупустынный и крайне сухой пустынный при значениях ГТК от 0.5 до меньше 0.3 [Панкова и др., 2014]. Большая часть Черноярского района расположена в пределах Сарпинской низменности. Растительность относится к полупустынному типу. Современный растительный покров пастбищ характеризуется травостоем, состоящим из засухоустойчивых и солевыносливых видов растений, представленных костром кровельным, мятликом луковичным, эбелеком, верблюжьей колючкой, а также типчаком, житняком пустынным, прутняком простертым, ковылью, солодкой. Почвообразующими породами являются засоленные ниже- и среднехвалынские глины. Местами древнеморские отложения перекрыты аллювиально-дельтовыми, более легкими отложениями протоков Волги. Средний уровень залегания грунтовых вод 10-20 м.

Почвенный покров представлен преимущественно светло-каштановыми солонцеватыми и бурыми полупустынными почвами Прикаспийской провинции [Панкова и др., 2014]. Светло-каштановые сухостепные почвы характеризуются осветленным бесструктурно-слоеватым гумусовым горизонтом (А), мощностью 15 см (иногда более); явно выраженным уплотненным бурым горизонтом (В1) комковатой структуры (15-30 см); глубже 30-40 см горизонт В1 переходит в плотный белоглазково-карбонатный горизонт (С), который на глубине 80-120 см переходит в более рыхлый горизонт С с кристаллами гипса и легкорастворимых солей.

Бурые полупустынные почвы характеризуются следующим профилем: горизонт А сверху представлен крупнопористой корочкой (2-4 см), ниже идет слоеватый светло-серый горизонт (12-15 см); глубже горизонт В – бурый крупно-комковатый, уплотненный, который сменяется горизонтом В - плотным комковато-ореховатым с белоглазкой (мощностью 25-40 см); еще

глубже лежит горизонт ВС – с гипсовыми выделениями и далее С – более рыхлый, с легкорастворимыми солями и гипсом. Вскипание от HCl может наблюдаться с поверхности, а иногда отмечается до глубины около 12 см.

Целесообразность разделения бурых полупустынных и светло-каштановых почв постоянно оспаривается. По Классификации почв 2004 года, светло-каштановые почвы не выделяются. Они включены в тип каштановых и объединены с бурыми аридными почвами в один отдел – аккумулятивно-карбонатных малогумусных почв. Сельскохозяйственные угодья представлены пашней, пастбищами, естественными кормовыми угодьями и сенокосами. Пашни используются под посевы зерновых, овощных и кормовых культур. Практикуется орошаемое земледелие.

2.1.4. ОТБОР ПОЧВЕННЫХ ОБРАЗЦОВ И ГАЗОВЫХ ПРОБ

Отбор почвенных образцов. Почвенные образцы отбирали на территории склонового ландшафта, расположенного на правом берегу реки Ока, с целью оценки распределения архей, бактерий и грибов по катене и определения влияния физико-химических свойств почв, залегающих в пределах катены, на микробное сообщество и скорость потоков парниковых газов. В пределах трансекты длиной 960 м были выбраны контрольные точки, соответствующие автономной (точка 1), транзитной (точки 2 и 3), транзитно-аккумулятивной (точка 4) и аккумулятивной (точка 5) позициям катены (рис. 8). Расстояние между точками 1 и 2 составляло 130 м, 2 и 3 – 550 м, 3 и 4 – 220 м, 4 и 5 – 60 м. Перепад высот между верхней и нижней точками склона достигал 80 метров: между точками 1 и 2 - 5 м, 2 и 3 – 15 м, 3 и 4 – 25 м, 4 и 5 – 35 м. Автономная, транзитная и транзитно-аккумулятивная части ландшафта представлены серой лесной почвой разной степени смытости залежной и лесной экосистем, а аккумулятивная – интразональной аллювиально-луговой почвой лугово-болотной экосистемы. Доминирующая растительность залежной экосистемы автономной позиции – рыхлокустовые и корневищные злаковые травы, лесной экосистемы транзитной позиции –

вторичный мелколиственный лес, лесной экосистемы транзитно-аккумулятивной позиции – смешанный лес, лугово-болотной экосистемы аккумулятивной позиции – лугово-болотная ассоциация. Образцы почвы в зависимости от целей исследований либо из верхнего 0-15 см слоя, либо из трех горизонтов до глубины 70 см.

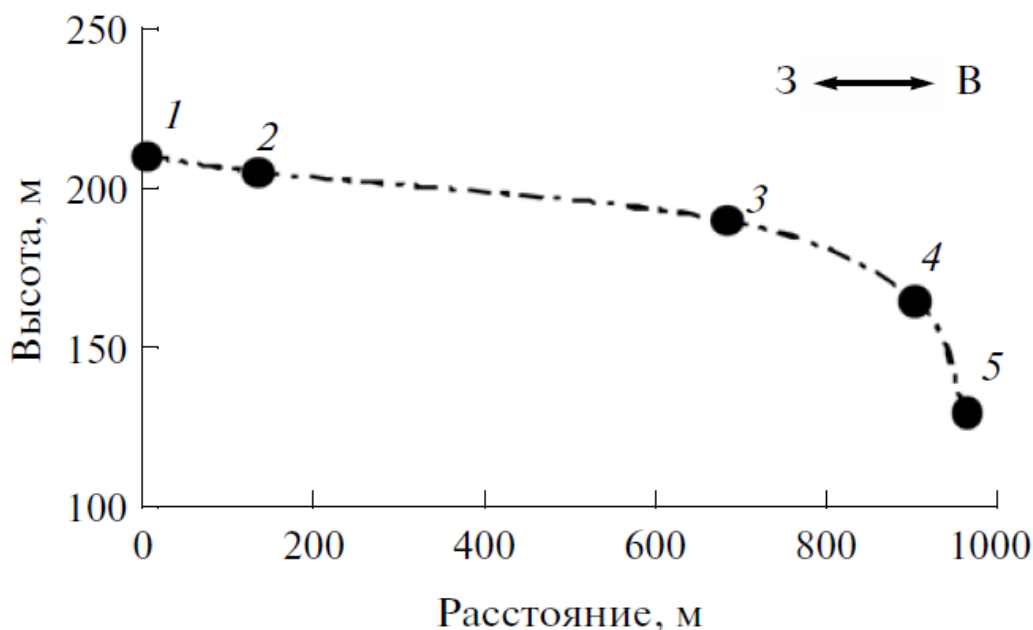


Рис. 8. Расположение объектов исследования (правобережье р. Любожихи в бассейне р. Оки). 1 – автономная, 2, 3 – транзитная, 4 – транзитно-аккумулятивная, 5 – аккумулятивная части ландшафта.

Образцы чернозема типичного (Воронежская обл., Таловский р-н) и бурой полупустынной почвы (Астраханская обл., Черноярский р-н), отбирались по горизонтам профиля на необрабатываемых (лесополоса и целинное разнотравье соответственно) угодьях и участках пашни. Полевой севооборот на типичном черноземе был представлен чередованием зерновых и пропашных культур с традиционной для этой зоны агротехникой возделывания культур. На бурой полупустынной почве возделывание полевых культур предусматривало орошение. В черноземе типичном образцы отбирали из двух слоев горизонта А1 и из горизонта АВ до глубины 70 см, а в бурой полупустынной почве – из шести горизонтов (А, АВ, В, ВС, С1 и С2) до глубины 140 см.

Отбор почвенных образцов производился из трех стенок почвенного разреза посередине выделенных генетических горизонтов в трехкратной повторности. Свежеотобранные образцы хранили при температуре +5°C, а для молекулярно-биологических исследований – при -70°C. Для определения физико-химических свойств почв использовали воздушно-сухие образцы. Основные физико-химические свойства почв, залегающих в разных позициях склонового ландшафта, приведены в работе [Семенов и др., 2010].

Отбора газовых проб. Определение скорости потоков парниковых газов (CO₂, CH₄, N₂O) *in situ* проводили методом закрытых камер. На зачищенной от растительности поверхность почвы каждого из 5-ти мониторинговых участков катены устанавливали по три изолятора, вреза на глубину 4-5 см. Объем изолятора 0.6 л., площадь – 58 см². Расстояние между изоляторами на месте каждой точки 2-3 м. Отбор газовых проб производили трижды: дважды летом (24 и 25 июня) и один раз осенью (22 сентября) в одно и то же время суток между 10 и 11 часами утра. Время экспозиции – 45 мин. Газовые пробы из изоляторов отбирались до и после экспозиции с помощью шприца объемом 10 мл и переносились в вакуумированные стерильные флаконы. Параллельно измерялась температура воздуха и почвы. Вблизи от изоляторов методом «конверта» отбирали образцы почвы из слоя 0-15 см на влажность и химический анализ.

Чтобы определить вклад разных слоев верхнего горизонта почв катены в обмен парниковых газов, были проведены дополнительные исследования (1 июля) с отбором газа не только с открытой поверхности почвы, но и с поверхности почвы зачищенной на глубине 10 и 20 см после удаления 0-10 и 0-20 см слоев соответственно. Для этого на точках автономной (точка 1), транзитной (точка 3) и аккумулятивной (точка 5) части ландшафта за час до отбора газовых проб делали по две прикопки размером 50 × 50 × 30 см в виде порожков. Изоляторы устанавливали непосредственно перед отбором газовых проб. Время экспозиции и процедура отбора газовых проб были те же, что и в основном исследовании.

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гранулометрический состав почв определяли 1) методом пипетки с обработкой почвы пирофосфатом натрия и 2) на лазерном дифракционном анализаторе размера частиц «Analysette 22 comfort» (FRITSCH, Germany) после диспергирования агрегатов ультразвуком [Милановский и др., 2011]. Содержание валового органического углерода (Сорг) и общего азота (Nобщ) в почвенных образцах определяли соответственно по методу Тюрина и индофеноловым методом после мокрого сжигания разбавленной 1:2 H₂SO₄ в присутствии катализатора (задачи оценки скорости потоков парниковых газов) и с помощью автоматического HCNS-анализатора “Elementar Vario EL III” (США) при исследовании микробных сообществ. Величины pH почв измеряли в 1 М растворе KCl с соотношением почва:раствор, равном 1:2, потенциометрическим способом. В отдельных образцах почв определяли содержание N-NH₄⁺ и N-NO₃⁻ в вытяжке 0.5 н. K₂SO₄ колориметрическим методом. Весовую влажность почвы определяли высушиванием образцов при температуре 105°C в течение 24 ч.

2.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ МЕТОДОМ ФУМИГАЦИИ-ЭКСТРАКЦИИ И СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ

При определении микробной биомассы с помощью метода фумигации-экстракции [Vance et al., 1987] к образцам свежей нефумигированной почвы массой 5 г добавляли раствор 0.05 М K₂SO₄ объемом 20 мл, после чего полученные суспензии встряхивали в течение 1 ч на ротаторе. Такую же процедуру проводили с образцами фумигированной парами хлороформа почвы. Фумигацию проводили в эксикаторах при комнатной температуре в течение 24 ч. После пятиминутного центрифугирования почвенной суспензии отфильтровывали супернатант. Модификацию с использованием центрифугирования почвенной суспензии применяли с целью сокращения

времени фильтрации. Содержание экстрагированного углерода в вытяжках измеряли на C/N анализаторе (multi N/C analyzer 2100S, Analytik Jena, Germany). Величину углерода микробной биомассы определяли расчетным методом как разницу между экстрагированным углеродом фумигированной и нефумигированной почвы, умноженную на стандартный коэффициент пересчета k_{EC} , равный 0.45 [Joergensen, Mueller, 1996].

Для определения микробной биомассы с помощью метода субстрат-индуцированного дыхания (СИД) [Anderson, Domsch, 1978] навеску свежей почвы (1 г) помещали во флакон (объем 15 мл), добавляли водный раствор глюкозы (0.2 мл; концентрация 10 мг г⁻¹ почвы), герметично закрывали и фиксировали время. Обогащенный глюкозой образец почвы инкубировали (4 ч, 22°C), затем отбирали газовую пробу из флакона шприцем (время также фиксировали) и анализировали на газовом хроматографе КристалЛюкс 4000М (детектор – катарометр). Скорость СИД выражался в мкл СО₂-С г⁻¹ почвы ч⁻¹. Углерод микробной биомассы (мкг С г⁻¹ почвы) рассчитывали по формуле (15):

$$C_{\text{мик}} = \text{Скорость СИД} \times 40.04 + 0.37 \quad (15).$$

Базальное дыхание (БД) определялось как СИД почвы с добавлением воды вместо раствора глюкозы за 24 ч. Скорость базального дыхания выражали в мкг СО₂-С г⁻¹ почвы ч⁻¹. Удельное дыхание микробной биомассы (микробный метаболический коэффициент, qCO_2) рассчитывали как отношение скорости базального дыхания к микробной биомассе (16):

$$qCO_2 = \text{БД} / C_{\text{мик}} (\text{мкг СО}_2\text{-С мг}^{-1}\text{С}_{\text{мик}} \text{ч}^{-1}) \quad (16).$$

2.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ В БИОМАССЕ ПОЧВ МЕТОДОМ СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ

Для определения вклада грибов и бактерий в СИД почвы использовали стрептомицина сульфат (C₂₁H₃₉N₇O₁₂ × 3H₂SO₄, AppliChem, CAS-No: 3810-74-0; 0.1 мл водного раствора + 0.1 мл глюкозы) и циклогексимид

(C₁₅H₂₃NO₄, AppliChem, CAS-No: 66-81-9, порошок + 0.2 мл глюкозы), которые вносили в почву по отдельности, устанавливая изменения в СИД. Циклогексимид добавляли в почву за 4 ч до внесения глюкозы, а стрептомицин - за 0.5 ч. Для лучшего распределения циклогексимид использовали инертный наполнитель (тальк), масса которого была равна таковой ингибитора. Контролем ингибирования СИД антибиотиками была навеска почвы с глюкозой (10 мг г⁻¹ почвы).

Коэффициент перекрывания активности антибиотиков (ПАА) рассчитывался по уравнению 17:

$$\text{ПАА} = [(A-B)+(A-C)] / (A-D) \quad (17),$$

где А–дыхание (выделение CO₂) почвы с глюкозой, В–дыхание почвы с глюкозой и фунгицидом, С–дыхание почвы с глюкозой и бактерицидом, D–дыхание почвы с глюкозой, бактерицидом и фунгицидом [Bailey et al., 2002].

Соотношение грибного (Г) и бактериального (Б) вклада в СИД определяли по формулам 18 и 19:

$$\Gamma = (A-B) / (A-D) \times 100\% \quad (18),$$

$$B = (A-C) / (A-D) \times 100\% \quad (19),$$

при условии, что $A - [(A-B)+(A-C)] = D \pm 5-10\%$ [Lin, Brookes, 1999].

2.2.3. ЭКСТРАКЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК

Для выделения ДНК из почв использовали два кита – MP Biomedicals FastDNA® SPIN kit for Soil и MO BIO PowerSoil® DNA Isolation kit. Эффективность экстракции ДНК верифицировалась путем добавления известного количества лямбда ДНК стандарта к стерильной, трехкратно автоклавированной почве, не содержащей ДНК. Поскольку FastDNA® SPIN kit for Soil обеспечивал достаточный выход ДНК с высокой эффективностью экстракции, мы выбрали данный кит для дальнейшей работы.

Почвенную ДНК экстрагировали из образцов массой 0.5 г с помощью кита FastDNA® SPIN kit for Soil (MP Biomedicals, Germany) согласно

протоколу производителя. Перед процедурой экстракции, почвы хранились в морозильнике при температуре минус 20°C. Почвенные образцы помещались в специальные флаконы (lysing matrix tubes), содержащие кремниевые и стеклянные шарики различного диаметра, после чего во флаконы добавлялись растворы натрий-фосфатного буфера (Na_2HPO_4 ; pH 8.0, 0.12 M) и MT-буфера (буфер на основе растворов SDS, Tris и пр). Почвенная суспензия во флаконах подвергалась интенсивной гомогенизации с помощью гомогенизатора FastPrep®, после чего проводили осаждение белков с помощью раствора, состоящего из 150 мкл 3 M CH_3COOK и 4%-ой уксусной кислоты. Находящаяся в растворе ДНК связывалась кремниевым матриксом, промывалась солевым раствором этанола (ультра-чистый 100% этанол и 0.1 M раствор ацетата натрия) и элюирировалась водой, очищенной от ДНазы. Выделенные экстракты ДНК хранились при температуре -20 °C.

Количественное определение дцДНК проводилось путем 150-кратного разбавления экстрактов ДНК, выделенных из почвы, в растворе TE-буфера (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Аликвоты объемом 1 мл переносились в 96-ячеечные микроплашки. Флюоресцентный краситель PicoGreen® (Molecular Probes, Life Technologies, Germany), селективно связывающийся с дцДНК, разбавляли в 200 раз и вносили в объеме 0.1 мл в ячейки с раствором ДНК (итоговое разбавление экстракта ДНК – 300 раз). По прошествии 2-минутной инкубации, мерили активность флюоресценции с использованием автоматического флюорометра (Wallac 1420, Perkin Elmer, Turku, Finland) в диапазоне возбуждения 485нм и эмиссии – 525 нм. дцДНК-лямбда использовался в качестве стандарта; образцы дцДНК для приготовления калибровочной кривой готовились по методике, идентичной описанной выше [Vlagodatskaya et al., 2014].

Пересчет дцДНК в Смик производился с использованием коэффициентов, полученных на основании линейных зависимостей дцДНК с микробной биомассой, измеренной методами СИД и ФЭ. Пересчетные коэффициенты ($F_{\text{днк}}$) дцДНК в углерод микробной биомассы,

ориентированные на величины $C_{\text{мик}}$ по методам СИД и ФЭ, равные 5.10 и 4.41 соответственно, были идентичными для черноземных, бурых полупустынных и серых лесных почв и совпадали с таковыми, полученными в других работах. Углерод микробной биомассы рассчитывался по формуле 20:

$$C_{\text{мик}} (\text{мкг (г почвы)}^{-1}) = F_{\text{днк}} \times \text{дцДНК} (\text{мкг (г почвы)}^{-1}) \quad (20).$$

2.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КЛЕТОК

Процедура определения метаболически активных клеток бактерий и архей с использованием молекулярного метода гибридизации *in situ* (метод FISH) включала в себя десорбцию клеток от почвенных частиц, фиксацию клеток, нанесение фиксированного образца на поверхность предметного стекла, гибридизацию со специфичными пробами, и микроскопирование [Манучарова, 2008; Amann et al., 1995]. Десорбцию клеток осуществляли путем обработки почвенной суспензии ультразвуком. Фиксацию клеток проводили с помощью формальдегида. Для гибридизации использовали меченные флуоресцентным красителем Cy3 (~550/570 нм) рРНК-специфичные олигонуклеотидные пробы EUB338 (5'– GCT GCC TCC CGT AGG AGT –3'), EUB338-II (5'– GCT GCC ACC CGT AGG TGT –3') и EUB338-III (5'– GCT GCC ACC CGT AGG TGT –3') для определения клеток бактерий и ARCH915 (5'– GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT –3') для клеток архей [Amann, Ludwig, 2000; Daims et al., 1999]. Филогенетические группы в составе домена Archaea определялись с помощью специфических проб CREN537 (5'– TGA CCA CTT GAG GTG CTG –3'), EURY806 (5'– CAC AGC GTT TAC ACC TAG –3') и THAUM494 (5'– GAA TAA GGG GTG GGC AAGT –3') [Hong et al., 2014; Teira et al., 2004], соответствующих филумам *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota*.

Условия гибридизации и промывания различались в зависимости от используемой пробы. В течение гибридизации образцы инкубировали при температуре 46°C в герметичных сосудах, насыщенных парами воды, формамида и гибридизационного буфера. Этап промывки проходил при более высокой температуре (49°C) и осуществлялся для удаления избыточных молекул специфичной пробы, чтобы избежать неспецифического связывания.

Стекла с готовыми препаратами анализировали с помощью микроскопа ZEISS Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтрами Filter set 15 для Су3-меченых зондов. Количество метаболически активных микробных клеток в образцах определяли путем учета количества гибридизованных с зондами клеток в 50 полях зрения микроскопа на одной ячейке, с последующим расчетом численности на 1 г почвы по формуле 21:

$$N = S_1 \times a \times n/V \times S_2 \times c \quad (21).$$

где, N – число клеток в 1 г почвы; a – число клеток в одном поле зрения (усредненное по всем препаратам); S_1 – площадь препарата, мкм²; n – показатель разведения почвенной суспензии, мл; V – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; c – навеска почвы, г.

2.2.5. ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИЙ, АРХЕЙ И ГРИБОВ ПО КОЛИЧЕСТВУ ГЕНА 16S рРНК

Количественная оценка ДНК бактерий, архей и грибов осуществлялась методом ПЦР в реальном времени. Для определения концентрации очищенного препарата почвенной ДНК реакцию проводили в амплификаторе iCycler (Biorad) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле. Реакционную смесь готовили из препарата SuperMix Eva Green Biorad (концентрированный буфер с дезоксирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, MgCl₂, красителем EvaGreen и стабилизаторами).

Проводили калибровку зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов, по которой определяли концентрацию ДНК образцов с помощью программного обеспечения CFX Manager. В качестве стандартов для бактерий использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона *Esherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*. Проводили определение концентрации участков 16S рРНК, пересчитывая в количество копий данных участков на грамм почвы для бактерий, архей и грибов по формуле 22:

$$A = 5000 \times Q \quad (22),$$

где Q – концентрация ДНК в растворе, рассчитанная по калибровочному графику программой CFX Manager; A – количество копий участка 16S рРНК на грамм почвы (копий/г почвы); 5000 – коэффициент пересчета с учетом разведения экстракта ДНК.

2.2.6. АМПЛИФИКАЦИЯ И ПОДГОТОВКА К СЕКВЕНИРОВАНИЮ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПУЛА БИБЛИОТЕК И ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Качество полученных образцов геномной ДНК было проверено на электрофорезе в агарозном геле (рис. 9). Проводили амплификацию регионов V3-V4 гена 16S рРНК с использованием универсальных прямого и обратного праймеров:

16S ампликонный ПЦР прямой праймер = 5'
 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC
 AG

16S ампликонный ПЦР обратный праймер = 5'
 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTAT
 СТААТСС

Данные праймеры были выбраны как наиболее эффективные и успешные для проведения анализа [Klindworth et al., 2012]. После получения

ампликонов библиотеки были очищены и смешаны эквимольно с помощью SequalPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01). Результирующий пул библиотек был проверен на капиллярном электрофорезе (рис. 9).

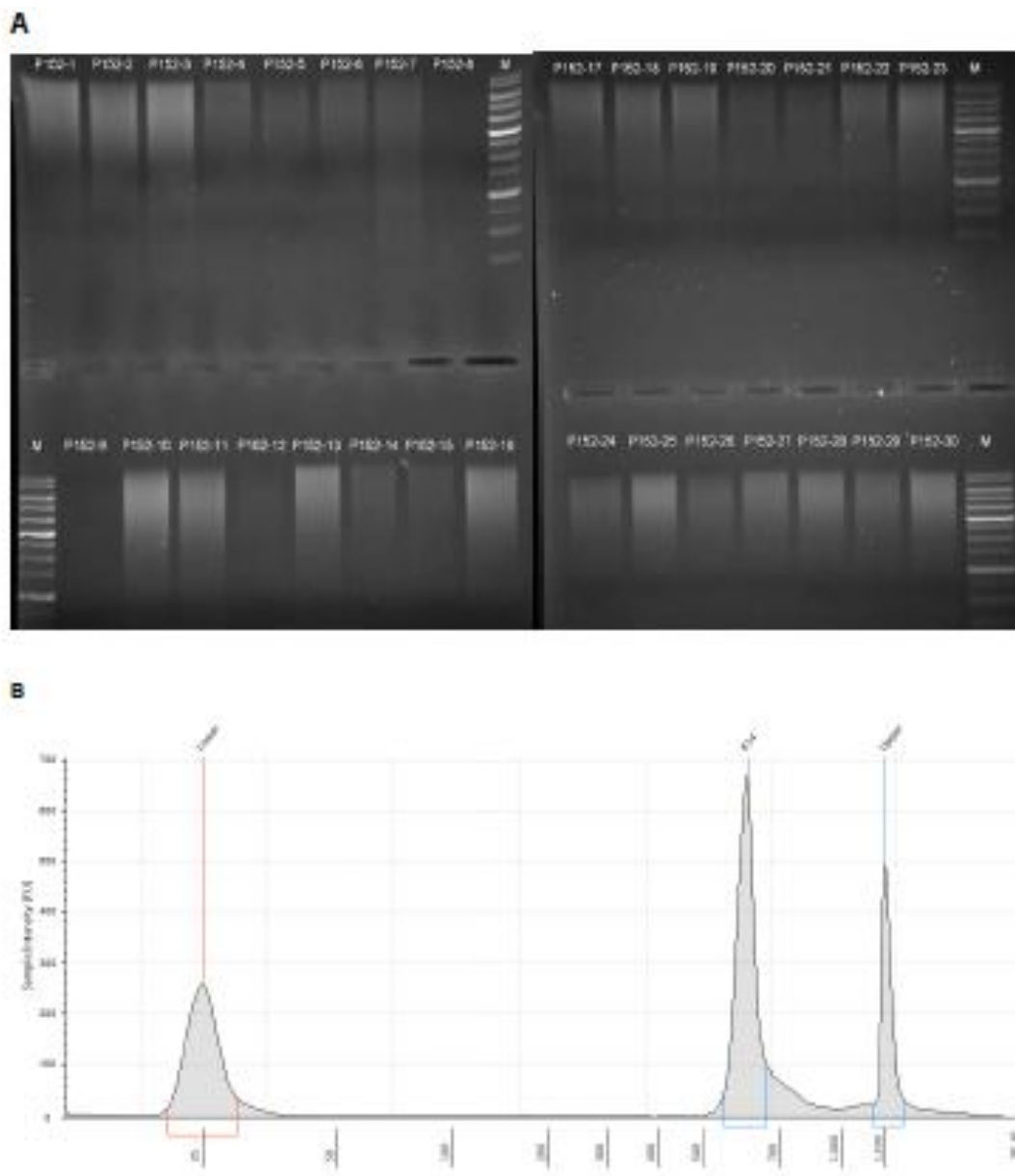


Рис. 9. А – результаты анализа исходных образцов ДНК на электрофорезе в агарозном геле, маркер 1Кб. В – результаты анализа пула готовых к секвенированию библиотек на Agilent TapeStation (HS D1000 tape).

Пул библиотек был отсеквенирован на Illumina MiSeq (251 цикл с каждой стороны фрагментов) с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). Образцы ДНК чернозема типичного были отсеквенированы на

приборе GSJunior (“Roche”, Швейцария) по отдельной методике. Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения MiSeq Reporter (Illumina). Результаты анализа метагеномных данных для каждого образца выполнены в программном обеспечении MiSeq Reporter Metagenomics workflow (Illumina), а также с использованием программного пакета QIIME [Caporaso et al., 2010].

2.2.7. ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГАЗОВЫХ ПРОБ

Концентрации CO₂, CH₄, N₂O в газовых пробах определялись на газовом хроматографе Кристалл 5000.1 (Россия) в Институте Микробиологии РАН. Газовый хроматограф этой марки оснащен пламенно-ионизационным и электронно-захватным детекторами. Результаты измерений газов в ppm пересчитывались на C-CO₂, C-CH₄ и N-N₂O. Величины потоков газов рассчитаны исходя из изменения их концентрации в закрытой камере за период экспозиции по формуле 23:

$$V = [(C_1 - C_0) \cdot M \cdot A \cdot S \cdot T] / 22.4 \cdot s \cdot t \quad (23),$$

где: V – скорость потока (мг/м² в час), C_0 и C_1 – концентрации газов до и после экспозиции, M – атомная масса углерода или азота, A – объем изолятора (мл), S – расчетная площадь (м²), T – расчетное время (час), s – площадь изолятора (см²), t – время экспозиции (мин).

2.2.8. СПЕЦИАЛЬНЫЕ РАСЧЕТЫ И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Все измерения выполнялись не менее чем в трех повторностях, рассчитывались на сухую почву, данные выражены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc.).

Экспериментальные корректирующие факторы, учитывающие поглощение почвой CO₂, были посчитаны как отношения между реально

выделившимся количеством CO_2 после добавления глюкозы и его измеренными значениями вследствие потерь от поглощения почвенным раствором. Значения реально выделившегося количества CO_2 были получены путем обратного пересчета значений ДНК-микробной биомассы, поскольку между величинами ДНК и полученным с помощью СИД углеродом микробной биомассы была получена четкая линейная зависимость, а также поскольку связь между выделяющимся при добавлении глюкозы CO_2 и углеродом микробной биомассой также имела линейный характер. Теоретические корректирующие факторы, учитывающие поглощение CO_2 , были рассчитаны на основе данных статьи Oren и Steinberger [2008], с помощью регрессионного уравнения $F_{\text{кор}} = 0.002 \times \exp(0.923 \times \text{pH})$, $R^2 = 0.91$. Из-за разного количества горизонтов и численных различий в массивах данных использовали корреляционный коэффициент Спирмена. Анализы, связанные с построением нелинейных регрессий, были выполнены с использованием программного обеспечения SigmaPlot 4.01 (SPSS Inc, Chicago, ILL).

2.3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЕРОЙ ЛЕСНОЙ, ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО И БУРОЙ ПОЛУПУСТЫННОЙ ПОЧВЫ

Физико-химические свойства почв склонового ландшафта. Самая высокая доля тонких фракций (0.005-0.001 и <0.001 мм) обнаруживалась в серой лесной почве автономной части ландшафта, а крупных 1-0.25 мм – в аккумулятивной части с аллювиально-луговой почвой (табл. 2). Доминирующей гранулометрической фракцией почв катены были частицы размером 0.05-0.01. Фракция этого размера преобладала в почвах транзитной и транзитно-аккумулятивной позиции склона. Доля «физического песка» в почвах возрастала вдоль катены, «физической глины» - снижалась, хорошо совпадая с направленностью массопереноса.

Таблица 2. Характеристика почв (0-10 см) разных точек катены бассейна р. Оки

Точка катены	C _{орг} , %	pH _{H2O}	N _{общ} , %	C / N	C _{мик} , мкг/г	БД, мкг CO ₂ -C/г·час	qCO ₂ , мкг CO ₂ -C/мг C _{мик} · час	Гранулометрический состав, %		
								1-0.25 мм	0.25-0.05 мм	<0.001 мм
1	1.70	6.24	0.162	10.5	262 ± 1 <i>a</i>	0.37 ± 0.01 <i>a</i>	1.43 ± 0.03	0.14	8.78	14.60
2	2.00	5.51	0.222	9.0	277 ± 15 <i>a</i>	0.67 ± 0.08 <i>c</i>	2.44 ± 0.19	0.48	8.32	13.56
3	1.96	5.19	0.199	9.8	175 ± 34 <i>b</i>	0.51 ± 0.05 <i>ab</i>	2.92 ± 0.72	0.74	13.50	11.36
4	1.93	5.05	0.173	11.2	192 ± 4 <i>b</i>	1.05 ± 0.14 <i>d</i>	5.48 ± 0.86	0.41	12.11	11.12
5	3.44	7.00	0.337	10.2	282 ± 39 <i>a</i>	0.56 ± 0.06 <i>bc</i>	2.00 ± 0.47	3.70	15.34	11.88

Примечание. C_{орг} – общий органический углерод почвы, N_{общ} – общий органический азот почвы, pH – кислотность почвы, C_{мик} – углерод микробной биомассы, БД – базальное дыхание, qCO₂ – микробный метаболический коэффициент. Цифры с разными буквами различаются достоверно ($p \leq 0.05$) по критерию Дункана (ANOVA) для C_{мик} и БД отдельно.

Химические свойства почв катены зависели как от местоположения, так и от типа доминирующей растительности (табл. 2). В серой лесной почве вдоль склона наблюдалось снижение рН водной и солевой вытяжек, суммы обменных катионов, содержания подвижных P_2O_5 и K_2O . В отличие от этих показателей наибольшее содержание органического углерода и общего азота в серой лесной почве было приурочено к верхней транзитной части ландшафта совпадающей с опушкой леса. Интразональная аллювиально-луговая почва принципиально отличалась по химическим показателям от серой лесной почвы. Для этой почвы характерна нейтральная реакция среды в отличие от других участков, содержание суммы обменных катионов, органического углерода и общего азота значительно было выше, чем в серой лесной. Это обусловлено тем, что в аллювиально-луговой почве, расположенной в аккумулятивной части ландшафта, накапливаются продукты поверхностного и бокового стока. В условиях периодического переувлажнения и близкого залегания грунтовых вод консервация отмершей биомассы лугово-болотной растительности преобладает над ее минерализацией, что хорошо подтверждается высокими содержаниями $C_{орг}$ и общего азота.

Значительный перепад высот по катене, разная глубина залегания грунтовых вод и разный тип растительности обуславливали значительную вариабельность температуры воздуха и гидротермических характеристик почвы между участками склона, особенно в летний период. В июньский день отбора газовых проб температура воздуха и почвы в автономной точке ландшафта была соответственно на 8 и 6, 11 и 8, 13 и 9°С выше, чем в транзитной, транзитно-аккумулятивной и аккумулятивной точках ландшафта. Наименьшая влажность почвы была характерна для почвы автономной части ландшафта, а наибольшая – для аккумулятивной. При отборе проб на следующий день гидротермические характеристики почвы были практически теми же самыми. В сентябрьский срок отбора различия по

температуре воздуха и почвы между точками ландшафта нивелировались. Влажность почвы автономной, транзитной и транзитно-аккумулятивной части ландшафтов увеличилась на 12-14, а аккумулятивной - почти на 40 вес. % по сравнению с июньским отбором. Таким образом, химические свойства почв и внешние условия среды в пределах даже непротяженной катены подвержены существенной изменчивости.

Содержание $C_{орг}$ в профиле чернозема типичного колебалось в диапазоне от 4.65 до 2.54%, $N_{общ}$ – от 0.35 до 0.21% от массы почвы, уменьшаясь с глубиной (табл. 3).

Таблица 3. Основные химические характеристики чернозема типичного и бурой полупустынной почвы

Горизонт (глубина, см)	$C_{орг}$, %	$N_{общ}$, %	C:N	pH
Чернозем типичный (лесополоса)				
A ₁ (0 – 18)	4.65 ± 0.25	0.347	13.4	6.51
A ₁ (18 – 45)	3.29 ± 0.27	0.263	12.5	6.85
AB (45 – 74)	2.54 ± 0.25	0.207	12.3	7.63
Чернозем типичный (пашня)				
A _{пах} (0 – 23)	3.61 ± 0.22	0.282	12.8	7.10
A ₁ (23 – 39)	3.42 ± 0.14	0.267	12.8	7.64
AB (39 – 69)	2.72 ± 0.07	0.214	12.7	7.72
Бурая полупустынная почва (целина)				
A (0 – 17)	0.56 ± 0.01	0.055	10.1	8.55
AB (17 – 30)	0.57 ± 0.01	0.069	8.4	8.42
B (30 – 40)	0.53 ± 0.01	0.065	8.2	8.55
BC (40 – 60)	0.35 ± 0.02	0.043	8.1	8.63
C ₁ (85 – 120)	0.14 ± 0.04	0.018	7.7	8.34
C ₂ (120 – 140)	0.12 ± 0.05	0.016	7.7	9.08
Бурая полупустынная почва (пашня)				
A _{пах} (0 – 10)	0.89 ± 0.01	0.075	11.8	8.46
AB _{пах} (10 – 27)	0.40 ± 0.01	0.051	7.9	8.42
B (27 – 45)	0.23 ± 0.04	0.020	6.2	8.63
BC (45 – 65)	0.12 ± 0.02	0.019	6.4	8.66
C ₁ (85 – 120)	0.11 ± 0.01	0.020	5.6	8.37
C ₂ (120 – 140)	0.11 ± 0.01	0.018	6.2	8.94

Различия в содержании $C_{\text{орг}}$ и $N_{\text{общ}}$ в черноземе под лесополосой и пашней наблюдались в основном в верхнем горизонте, тогда как в более глубоких слоях нивелировались. Чернозем типичный под пашней отличался более высоким рН на всех глубинах профиля. В отличие от чернозема типичного, бурая полупустынная почва отличалась крайне низкой обеспеченностью $C_{\text{орг}}$ и $N_{\text{общ}}$, и щелочной реакцией среды особенно в нижних горизонтах профиля (табл. 3).

Если в пахотном черноземе было меньше $C_{\text{орг}}$ по сравнению с образцами под лесополосой, то в поверхностном горизонте бурой полупустынной почвы содержалось больше $C_{\text{орг}}$ и $N_{\text{общ}}$, чем в почве целинного участка. Данное явление можно объяснить более низкой продуктивностью естественных ценозов, по сравнению с регулярно удобряемыми агроценозами, и как следствие, меньшим поступлением в почву растительных остатков. Регулярная обработка почвы способствует измельчению, перераспределению и ускоренному разложению растительных остатков с обогащением почвы доступным для микроорганизмов органическим веществом.

Таким образом, массив исследуемых объектов – почвы разных региональных биомов, местоположений в ландшафте и генетических горизонтов, позволяет получить объективные и релевантные почвенно-экологическим условиям данные о численности, структуре и активности компонентов микробного сообщества.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ИЗМЕРЕНИЕ ОБЩЕЙ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПОЧВЕННОЙ ДНК

Каждому из классических методов определения микробной биомассы свойственны ограничения, обусловленные как особенностями присущих процедур, так и спецификой физико-химических свойств разных почв. Два самых распространенных метода, субстрат индуцированного дыхания (СИД) и фумигации хлороформом – экстракции (ФЭ) дают в целом сопоставимые величины микробной биомассы в почве, но только преимущественно в условиях близких гомеостазу. Если постоянство физиологического состояния почвенных микроорганизмов не поддерживается, метод СИД дает недостоверные значения. Метод ФЭ не имеет подобного ограничения, демонстрируя чувствительность и после добавления в почву субстрата, но только до начала активного роста биомассы, после чего также становится не пригодным для измерения количества биомассы. Поэтому важно иметь метод, который бы не зависел ни от активности биомассы, ни от состояния внутриклеточных компонентов. Это требование соблюдается в полной мере при определении двухцепочечной ДНК (дцДНК), экстрагированной из почвенных микроорганизмов. В наших исследованиях предусматривалось 1) уточнить значения коэффициентов пересчета дцДНК на углерод микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$), 2) сопоставить значения $C_{\text{мик}}$, полученные методами дцДНК, СИД и ФЭ, 3) показать возможность использования метода дцДНК при оценке содержания $C_{\text{мик}}$ в разных почвенных экосистемах.

3.1.1. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ дцДНК, СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ И ФУМИГАЦИИ-ЭКСТРАКЦИИ

Значения дцДНК, выделенной с использованием FastDNA® SPIN kit for Soil, варьировали в диапазоне от 3 до 35 мкг дцДНК (г почвы)⁻¹ в бурой

полупустынной почвы и от 31 до 91 мкг дцДНК (г почвы)⁻¹ в черноземе. С помощью кита PowerSoil® DNA Isolation kit выделялось не более 20 мкг дцДНК (г почвы)⁻¹. Выход дцДНК китом FastDNA® SPIN kit for Soil колебался от 94% до 100% во всех случаях тестирования образцов.

Для серых лесных почв и черноземов, между значениями СИД-С_{мик} и общей почвенной дцДНК была получена тесная достоверная корреляция (рис. 10).

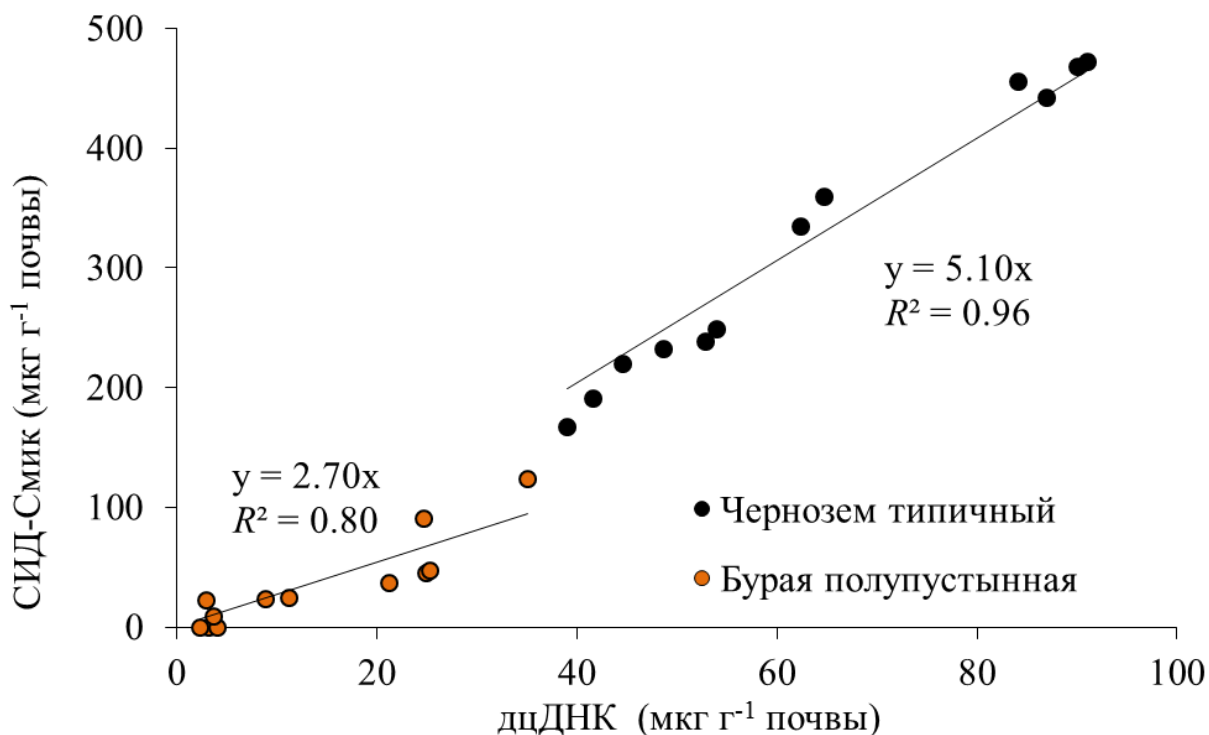


Рис. 10. Регрессии между количеством экстрагируемого из почвы дцДНК и СИД-С_{мик} для разных горизонтов исследуемых почв. Данные связаны положительной линейной связью с коэффициентом ранговой корреляции Спирмана 0.989.

Из полученного уравнения регрессии был посчитан коэффициент пересчета $F_{\text{DNA-SIR}}$, равный 5.10 ($R^2 = 0.96$). Для чернозема типичного были получены практически одинаковые величины общей микробной биомассы, определяемые методами дц-ДНК и СИД (ДНК-Смик и СИД-Смик), и оба этих метода давали одинаково распределение микробной биомассы в профиле под лесополосой и пашней (рис. 11).

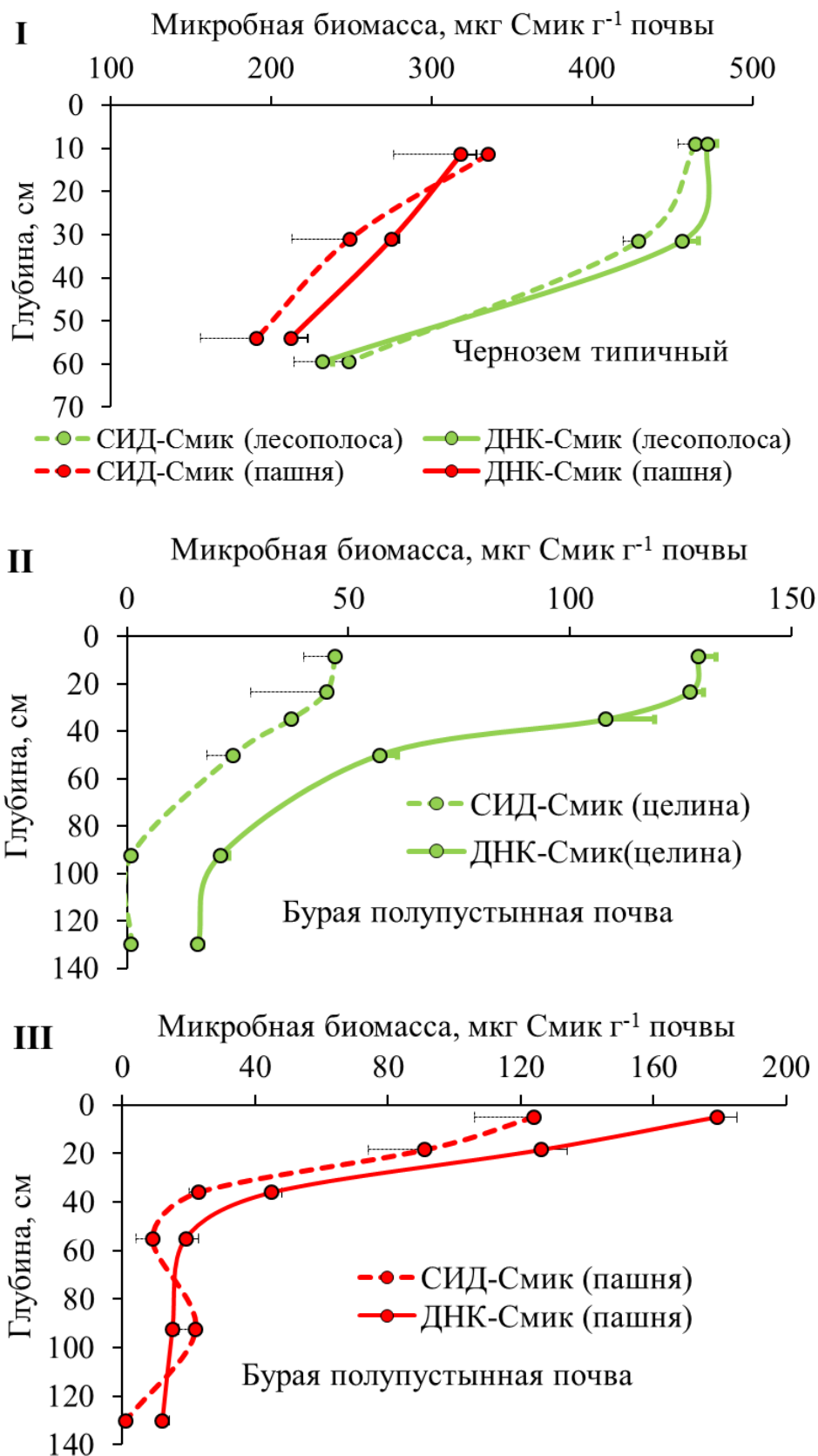


Рис. 11. Распределение микробной биомассы в профиле чернозема типичного (I) и бурой полупустынной почвы (II и III), полученной методами количественного определения дцДНК и СИД.

Полученные нами для бурой полупустынной почвы данные СИД показали ограниченные возможности применения этого метода для почв с щелочным рН (рис. 12).

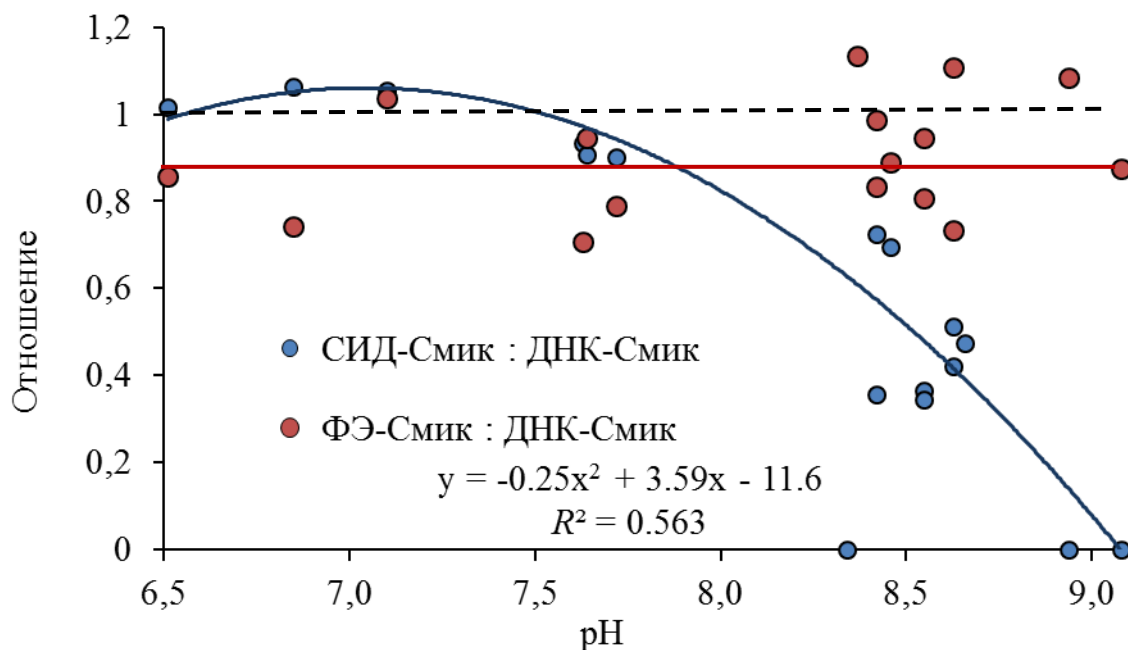


Рис. 12. Влияние величины рН на недоучет общей микробной биомассы, измеряемой методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД-С_{мик}) и независимый от рН недоучет С_{мик} при измерении методом ФЭ (черная пунктирная и оранжевая линии).

В связи с низкими значениями микробной биомассы, а также по причине поглощения CO₂ при рН > 8 в бурой полупустынной почве глубоких горизонтов субстрат-индуцированное дыхание не детектировалось, т.е. потенциал поглощения CO₂ был выше, чем его выделение после добавления глюкозы. Это привело к тому, что значения СИД и, соответственно, СИД-С_{мик} равнялись нулю (рис. 11). Тем не менее, во всех образцах бурой полупустынной почвы были получены ненулевые значения дцДНК.

Из-за нечувствительности метода СИД в щелочных условиях пересчетный коэффициент F_{DNA-SIR} для бурой полупустынной почвы оказался равен 2.70 со значительно более низким коэффициентом детерминации ($R^2 =$

0.80) (рис. 10). В связи с этим, результаты бурых полупустынных почв не были включены в общую регрессионную зависимость между дцДНК и СИД (рис. 10), а для расчета углерода микробной биомассы в бурых полупустынных почвах был использован стандартный коэффициент пересчета $F_{\text{DNA-SIR}}$, равный 5.10.

Методы ФЭ и ДНК продемонстрировали высокую сходимость результатов для всех исследованных типов почв с коэффициентом пересчета $F_{\text{DNA-FE}} = 4.41$ ($R^2 = 0.97$) и коэффициентом вариации 19.4% (рис. 13).

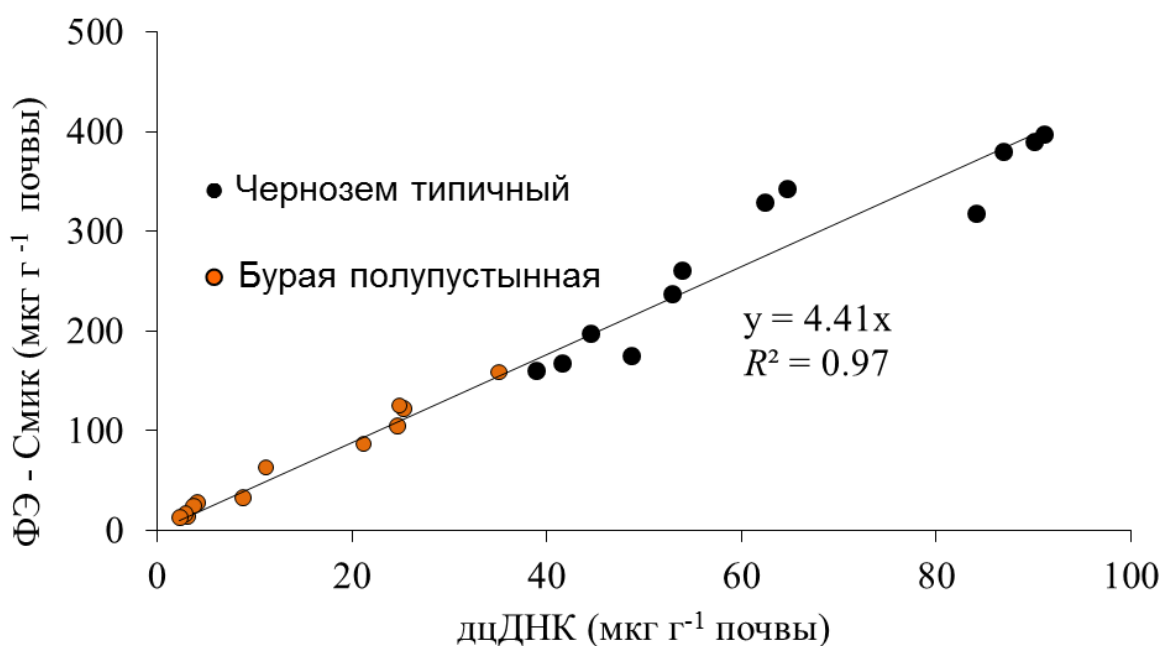


Рис. 13. Регрессия между количеством экстрагируемой из почвы дцДНК и углеродом микробной биомассы, полученного методом ФЭ (ФЭ-С_{мик}) для разных горизонтов исследуемых почв. Данные связаны положительной линейной связью с коэффициентом ранговой корреляции Спирмана 0.995.

Соотношение между корректирующими коэффициентами $F_{\text{DNA-SIR}}$ и $F_{\text{DNA-FE}}$ равное 1.156 указывает либо на недоучет микробной биомассы фумигацией-экстракцией, либо на завышенную оценку микробной биомассы методом СИД. Подобный сдвиг результатов может быть связан с варьированием пересчетных коэффициентов самих методов ФЭ и СИД,

обусловленным разными свойствами почв [Kaiser et al., 1992; West et al., 1986].

Полученный нами пересчетный коэффициент $F_{\text{DNA-SIR}} = 5.10$ был близким установленным в других исследованиях в пределах от 5.0 до 6.0 [Anderson, Martens, 2013; Joergensen, Emmerling, 2006]. В свою очередь, пересчетный коэффициент $F_{\text{DNA-FE}}$ равный 4.41 также был в диапазоне значений (от 3.9 до 4.6), полученных в других работах [Gong et al., 2001; Marstorp, Witter, 1999]. Таким образом, метод количественного определения ДНК дает реальные величины $C_{\text{мик}}$, хорошо сопоставимые с результатами, полученными методами ФЭ и СИД в почвах и может служить эффективной и удобной альтернативой базовым методам по определению микробной биомассы в условиях, при которых данные методы имеют принципиальные ограничения. Особо неоднозначным является определение $C_{\text{мик}}$ в щелочных карбонатных почвах методом СИД. В щелочной бурой полупустынной почве методом СИД получался ощутимый (в 2-4 раза) недоучет микробной биомассы по сравнению с ФЭ и ДНК методами (рис. 11). Одной из причин недоучета микробной биомассы в щелочных почвах методом СИД может быть поглощение CO_2 и его обмен с почвенными карбонатами [Kuzyakov et al., 2006]. В свою очередь, обмен между HCO_3^- в растворе и продуцируемым микроорганизмами CO_2 может приводить к обмену изотопами углерода. Это затрудняет или делает невозможным получение точных коэффициентов пересчета СИД и ФЭ в $C_{\text{мик}}$ для щелочных карбонатных почв, которое базируется на определении природного содержания изотопа ^{13}C или использовании меченых по ^{13}C или ^{14}C соединений. В этом случае количественное определение дцДНК может быть альтернативным и единственно объективным методом измерения микробной биомассы.

Важно отметить, что метод количественного определения дцДНК также имеет определенные ограничения при измерении микробной биомассы. Прежде всего, на величину пересчетного коэффициента F_{DNA}

могут влиять различные факторы, например, наличие внеклеточной ДНК либо неудовлетворительная степень экстракции из почвы общей ДНК [Bakken, Frostegård, 2006; Pietramellara et al., 2009]. Эффективность экстракции почвенной ДНК может варьировать для разных типов почв, различающихся по гранулометрическому составу и химическим свойствам. Полная экстракция может быть лимитирована недостаточным лизисом клеток, потерями в связи с ферментативным разложением, сорбцией коллоидными частицами, а также потерями во время этапа очистки от моно- и олигофенолов и гуминовых веществ [Marstorp, Witter, 1999]. Кроме того, для количественного анализа первостепенное значение имеет подбор подходящего кита, основываясь на процентном выходе ДНК из почв. Если для многих молекулярно-биологических методов необходимы высокая степень очистки и "мягкая" экстракция, чтобы избежать риска возникновения химерных кусков ДНК, для количественной оценки почвенной ДНК нужен метод экстракции, включающий в себя "жесткую" химическую и физическую обработку (гомогенизация кремниевыми и стеклянными шариками, обработка ультразвуком), обеспечивающую максимальный выход ДНК. Во-вторых, такой метод экстракции также должен включать в себя лишь необходимый минимум этапов очистки, чтобы предотвратить потери ДНК. Как показано выше, результаты количественного определения дцДНК существенно отличаются при использовании разных китов.

3.1.2. СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕЙ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ В ПОЧВАХ КАТЕНЫ И ГОРИЗОНТАХ ПРОФИЛЯ

Доля углерода микробной биомассы в валовом содержании почвенного органического вещества ($C_{\text{мик}}:C_{\text{орг}}$) является одновременно одним из эколого-физиологических параметров состояния микробного сообщества, отражающим его трофический статус, и показателем биологической активности почвы, изменяющейся под краткосрочными или

долговременными воздействиями природных и антропогенных нарушающих воздействий. Полученное путем количественного определения дцДНК содержание углерода микробной биомассы (дцДНК-С_{мик}) может быть использовано в разных целях, предусматривающих оценку участия микроорганизмов в формировании свойств почвы и поддержания биотических процессов.

В верхнем горизонте серой лесной почвы автономного и транзитного участков склонового ландшафта под залежью и широколиственным лесом соответственно содержалось 302 и 453 мкг/г дцДНК-С_{мик}, в аллювиально-луговой почве аккумулятивной позиции ландшафта под луговой растительностью – 840, в горизонтах А1 и Апах чернозема типичного под лесополосой и пашней – 465 и 318, а в горизонтах А и Апах бурой полупустынной почвы под целиной и пашней – 129 и 179 мкг/г дцДНК-С_{мик}.

Во всех почвах разных местоположений наблюдалось уменьшение содержания дцДНК-С_{мик} вниз по профилям. В горизонтах АВ и В серой лесной почвы автономной части ландшафта содержалось в 3.2 и 4.8 раз меньше дцДНК-С_{мик}, чем в горизонте А, в серой лесной почве транзитной части соответственно в 11.3 и 12.9 раз, а в аллювиально-луговой почве катены – в 4.1 и 4.5 раза. В необрабатываемом черноземе типичном под лесополосой в нижней части гумусового горизонта А1 и в переходном горизонте АВ количество дцДНК-С_{мик} было 1.1 и 1.9 раза меньше, чем в верхней части горизонта А1, а под пашней в нижних горизонтах А1 и АВ было в 1.2 и 1.5 раза меньше, чем в Апах. В бурой полупустынной почве под целинной растительностью заметное уменьшение содержания общей микробной биомассы начиналось с горизонта В, в котором обнаруживалось в 1.2 раза меньше дцДНК-С_{мик}, чем в горизонтах А и АВ, а на глубинах 40-60, 85-100 и 120-140 см, соответствующих горизонтам ВС, С1 и С2 – в 2.3, 6.1 и 8.1 раз. Для пахотной бурой полупустынной почвы была характерна более отчетливая дифференциация распределения дцДНК-С_{мик} по сравнению с

целинной. С увеличением глубины расположения горизонта содержание дцДНК- $C_{\text{мик}}$ уменьшалось по сравнению с верхним 0-10 см слоем от 1.4 раза (слой 10-27 см) до 14.9 раз (слой 120-140 см).

Отношения $C_{\text{мик}}:C_{\text{орг}}$ являются индикатором доступности почвенного углерода для микроорганизмов [Anderson, 2003; Anderson, Domsch, 1989]. Сужение отношения $C_{\text{мик}}:C_{\text{орг}}$ в почве указывает на прочность стабилизации органического субстрата или на наличие экологических условий и физических барьеров, препятствующих освоению субстрата микроорганизмами [Семенов и др., 2009]. Увеличение содержания общей микробной биомассы в почвах от автономной позиции ландшафта к транзитной и аккумулятивной в 1.8 и 2.8 раза соответственно сопровождалось некоторым уменьшением ее доли в валовом $C_{\text{орг}}$. Этот факт согласуется с превалированием аккумуляционных процессов в трансформации органических материалов в переувлажненных условиях под лугово-болотной растительностью.

В пахотном черноземе по сравнению с залегающим под лесополосой отмечено сужение отношения $C_{\text{мик}}/C_{\text{орг}}$ на всех исследуемых глубинах, прежде всего в связи с уменьшением содержания микробной биомассы (рис. 14). Наоборот, в пахотной бурой полупустынной почве более обогащенным $C_{\text{орг}}$ и $C_{\text{мик}}$ по сравнению с целинным участком оказался верхний 0-10 см слой, а в более глубоких горизонтах содержалось одинаковое или меньшее количество общего и микробного углерода. Данное отличие можно объяснить меньшей продуктивностью естественных ценозов по сравнению с регулярно удобряемыми агроценозами в условиях аридного климата, и как следствие, меньшим поступлением в почву растительных остатков. Полученные для бурой полупустынной почвы значения $C_{\text{мик}}:C_{\text{орг}}$ оказались выше, чем в черноземе. Это говорит о высокой степени защищенности органического вещества в черноземе, что подтверждается также данными о низкой доле потенциально минерализуемого (т.е. активного) углерода в составе

почвенного органического вещества [Кузнецов и др., 2007; Семенов и др., 2008].

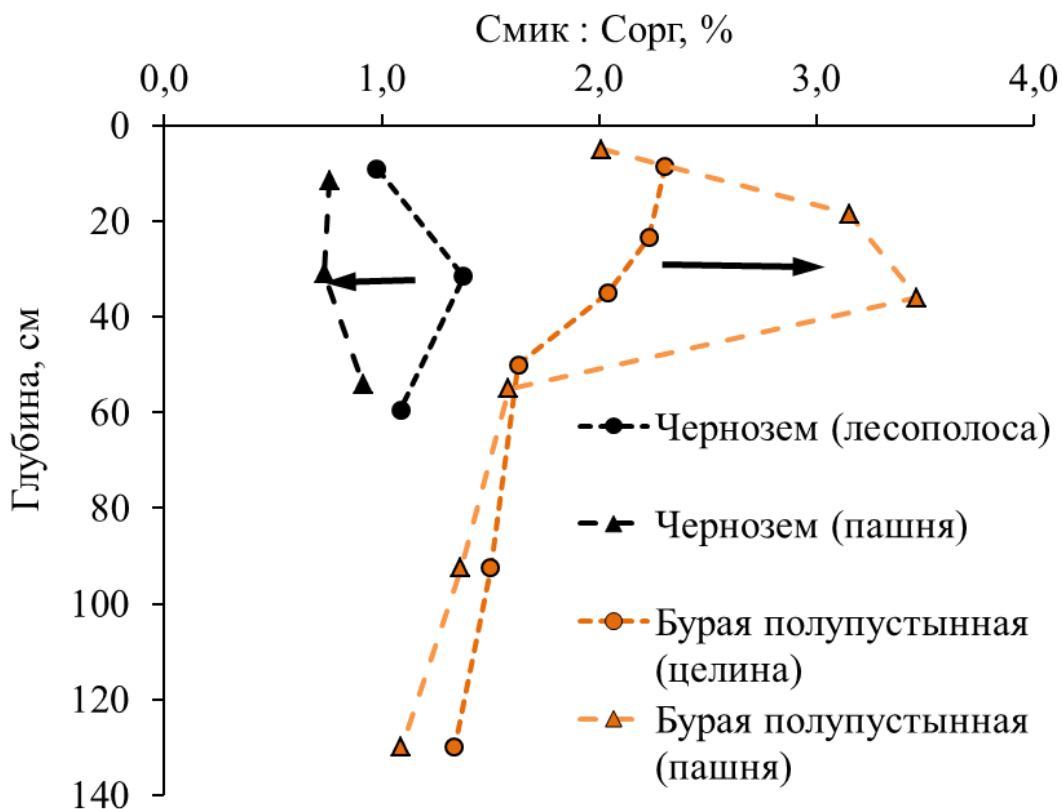


Рис. 14. Значения отношений $C_{мик} : C_{орг}$ для разных горизонтов исследуемых черноземов и бурых полупустынных почв. Используемые значения $C_{мик}$ получены методом количественного определения дцДНК.

Таким образом, несмотря на самое большое валовое содержание органического вещества и общепринятое представление как о самых богатых и очень плодородных почвах, черноземы характеризуются исключительно узким отношением $C_{мик}:C_{орг}$, указывающим на вероятность углеродного лимитирования микробного сообщества в этих почвах. Агрогенная нагрузка в пахотных почвах не всегда негативна для почвенного микробного сообщества. В почвах аридной зоны с низкими запасами органического вещества интенсивное возделывание сельскохозяйственных культур способствует обогащению почвы органическим веществом и увеличению микробной активности. Содержание общей микробной биомассы хотя и

коррелирует с валовым органическим веществом в почве, но отличается большей чувствительностью к почвенно-экологическим условиям и влиянию агрогенных факторов.

3.1.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественное определение дцДНК является эффективным способом измерения общей микробной биомассы в разных почвах, в том числе в щелочных бурых полупустынных почвах с высоким содержанием карбонатов. Сопоставление данных дцДНК с результатами определения микробной биомассы методами субстрат-индуцированного дыхания (СИД) и фумигации-экстракции (ФЭ) выявило наличие строгих и постоянных соотношений, позволяющих использовать их в качестве коэффициентов пересчета дцДНК в общую микробную биомассу почвы.

Количественная оценка микробной биомассы почв методом определения дцДНК позволяет преодолеть такие ограничения других базовых методов, как недоучет микробной биомассы методом СИД в щелочных и карбонатных почвах, и неточность ее измерения методом ФЭ из-за присутствия корневых остатков. Кроме того, экстрагируемые образцы дцДНК, помимо определения микробной биомассы, могут быть использованы для последующего исследования количественной ПЦР в реальном времени, а также при секвенировании.

3.2. СООТНОШЕНИЕ ГРИБНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ В ПОЧВЕ

Одним из подходов для понимания функционирования микробных сообществ почв является их дифференциация на экологически значимые группы: копиотрофы и олиготрофы, автохтонные и зимогенные, *r*- и *K*-стратеги, а также на эукариоты (грибы) и прокариоты (бактерии) [Strickland, Rousk, 2010]. Отношение грибы/бактерии хорошо отображает процессы разложения субстратов, трансформации питательных элементов и, как следствие, способность почвенных экосистем к саморегуляции [Bailey et al., 2002; Van der Heiden et al., 2008].

Для определения доли грибов и бактерий в биомассе почв наряду с прямым микроскопированием и определением специфических компонентов клеточной стенки и мембран используют метод селективного ингибирования (СИ) антибиотиками субстрат-индуцированного дыхания (СИД) [Anderson, Domsch, 1975]. Один из наиболее важных требований метода СИ – подбор концентрации антибиотиков, чтобы избежать их нецелевого влияния [Anderson, Domsch, 1975; Rousk et al., 2009]. Другой момент этого метода связан со степенью угнетения дыхания биоцидами [Velvis, 1997].

Отношение грибы/бактерии (Г/Б) особо чувствительно к нарушающим воздействиям на почву. Интенсивная обработка почвы [Frey et al., 1999; Bailey et al., 2002], внесением азотных минеральных удобрений [Frey et al., 2004] вызывали снижение отношения Г/Б. Показано также, что относительная биомасса грибов больше в естественных экосистемах по сравнению с пахотными почвами [Frey et al., 1999; Сусьян и др., 2005; Ананьева и др., 2006].

Однако до сих пор остаются неясными особенности пространственного распределения бактерий и грибов в почвах наземных экосистем, изменения в соотношении бактериального и грибного компонентов почвенного

сообщества в пределах сопряженного ряда естественных экосистем. Требуется уточнения вопрос о взаимосвязи между химическими свойствами почвы и структурой бактериально-грибного консорциума на локальном уровне. Естественной моделью для такого исследования могут служить почвы разных позиций ландшафта, слагающие катену. В наших исследованиях [Семенов и др., 2013] предусматривалось оптимизировать процедуру разделения вклада грибов и бактерий в общую микробную биомассу почвы и определить особенности структуры микробного сообщества (Г/Б) почвы разных частей ландшафта, представленных разными экосистемами (залежь, лес, луг) с разными почвенными физико-химическими свойствами.

3.2.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ДЫХАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО И ГРИБНОГО КОМПОНЕНТОВ СООБЩЕСТВА

Первая серия экспериментов была нацелена на определение концентрации стрептомицина и циклогексимида (внесены отдельно), обеспечивающей наибольшее подавление СИД почвы. Водный раствор стрептомицина вносили в почву исследованных точек (частей) склонового ландшафта в концентрации от 0.0625 до 32 мг / г (табл. 4). Для точек 2 и 4 устойчивое подавление СИД отмечено в широком интервале концентраций стрептомицина (1-32 мг/г почвы), а для точек 3 и 5 – только при высокой и низкой (16-32 и 0.0625-0.25 мг/г почвы соответственно). В почве 1 стрептомицин в исследованных концентрациях не вызывал подавления СИД, поэтому ее навеска была уменьшена в 2 раза (0.5 г). Подавление СИД в такой навеске почвы достигнуто стрептомицином в низкой концентрации (0.125-0.5 мг/г). Следовательно, для наибольшего подавления СИД почвы с рН 6-7 при использовании метода селективного ингибирования антибиотиками СИД требуется меньшая концентрация стрептомицина (< 1 мг/г), чем таковая в почве с рН 5.0-5.5. Стрептомицин обладает щелочными свойствами, поэтому в кислой почве он может терять свою активность. Ранее показана тесная

связь между рН (от 3.95 до 7.95) нескольких почв разных экосистем и концентрацией стрептомицина (0.5-40 мг / г), обеспечивающей наибольшее подавление СИД при отдельном внесении ($R^2 = 0.5$) [Стольникова, 2010].

В экспериментах выявлено, что высокие концентрации стрептомицина (0.5-32 мг / г) в кислой почве (точки 1 и 5) способствовали даже возрастанию СИД (табл. 4).

Таблица 4. Подавление субстрат-индуцированного дыхания (%) почвы разных точек катены при внесении стрептомицина

Концентрация стрептомицина, мг/г почвы	Точка катены					
	1	1*	2	3	4	5
0.0625	Н.о.	То же	-//-	-//-	-//-	3 ± 4
0.125	Н.о.	3 ± 5	Н.о.	То же	-//-	-1 ± 11
0.25	-21 ± 4	6 ± 1	Н.о.	То же	-//-	5 ± 7
0.5	-15 ± 9	9 ± 2	Н.о.	То же	-//-	-36
1	-7 ± 7	Н.о.	12 ± 1	-27 ± 15	16 ± 3	-30
2	-41	Н.о.	3 ± 2	-23 ± 2	9 ± 3	-26
4	-42	Н.о.	19 ± 5	-30 ± 4	16 ± 4	-47
8	-33	Н.о.	12 ± 3	-7 ± 1	27 ± 2	-47
16	-43	Н.о.	30 ± 6	2 ± 1	21 ± 6	-56
32	-45	Н.о.	25 ± 5	15 ± 6	35 ± 10	-71

Точки катены: 1 – автономная, 2, 3 – транзитная, 4 – транзитно-аккумулятивная, 5 – аккумулятивная части ландшафта. Н.о. – нет определения, для точки 1* навеска почвы 0.5 г.

Есть свидетельства использования этого бактерицида почвенными микроорганизмами в качестве источника углерода и азота [Stamatiadis et al., 1990]. Так, в условиях продолжительного контакта почвы со стрептомицином (> 2 сут) отмечено его потребление микроорганизмами [Badalucco et al., 1994]. К тому же, стрептомицин ингибирует синтез белка на 70S-рибосомах прокариотных и эукариотных микроорганизмов, вызывая тем самым повреждение части микробных клеток, которые могут быть дополнительным

питанием для других. Судя по результатам наших экспериментов, стрептомицин мог потребляться и в условиях его кратковременного контакта с почвой (4-5 час).

Циклогексимид вносили в почву в интервале концентраций от 5 до 60 мг/г (табл. 5). В точках 1, 2 и 4 угнетение СИД фунгицидом (20-60 мг/г) составило 40-60%, а в точках 3 и 5 – не более 15%. Поэтому для лучшего распределения фунгицида в точках 3 и 5, и следовательно большего угнетения СИД, циклогексимид вносили вместе с тальком в качестве инертного наполнителя в соотношении 1 : 1. Следует отметить также, что в точке 5 «удовлетворительное» подавление СИД циклогексимидом (45%) было отмечено при его более низкой концентрации (20 мг/г) по сравнению с другими точками.

Таблица 5. Подавление субстрат-индуцированного дыхания (%) почвы разных точек катены (Т) при внесении циклогексимида

Точка катены	Циклогексимид, мг / г почвы					
	5	10	20	30	40	60
1	Н.о.	Н.о.	38 ± 10	46 ± 2	51 ± 13	40 ± 10
2	То же	То же	47 ± 8	55 ± 4	49 ± 9	48 ± 4
3	-//-	-//-	4 ± 14	15 ± 11	11 ± 4	7 ± 13
3*	-//-	-//-	Н.о.	49 ± 1	Н.о.	Н.о.
4	-//-	-//-	49 ± 5	65 ± 13	57 ± 7	64 ± 10
5	-//-	-//-	8 ± 5	13 ± 4	7 ± 1	10 ± 1
5*	28 ± 5 a	31 ± 8 ab	45 ± 5 b	Н.о.	Н.о.	Н.о.

Примечание. Для почвы 5 цифры с разными буквами различаются достоверно ($p \leq 0.05$) по критерию Дункана (ANOVA); для почвы 1-4 – различие не достоверно. Н.о. – нет определения. * Циклогексимид с тальком (1 : 1).

Циклогексимид подавляет биосинтез белка эукариотных микроорганизмов, имеющих только 80S-рибосомы. Внесение этого фунгицида в почву приводит к довольно высокому подавлению СИД (38-65%). Однако в точках 3 и 5 (транзитная и аккумулятивная части ландшафта) наибольшее подавление СИД циклогексимидом было достигнуто в вариантах с добавлением талька (табл. 5). Этот факт можно объяснить, по-видимому, более высокой долей крупных почвенных частиц (0.25-1 и 0.05-0.25 мм) в точках 3 и 5 по сравнению с другими (табл. 2).

Вторая серия экспериментов связана с достижением наибольшего угнетения СИД почвы двумя антибиотиками (табл. 6). Интенсивность СИД в присутствии антибиотиков следует характеризовать степенью его подавления и значением ПАА. Значение ПАА – сумма угнетения дыхания микроорганизмов отдельными антибиотиками, деленная на угнетение дыхания их комбинацией [Bailey et al., 2002]. Значение $ПАА > 1$ свидетельствует о нецелевом угнетении общего чувствительного к антибиотику дыхания сообщества, а < 1 – об антагонистическом эффекте. Для расчета соотношения Г/Б в почвах агроэкосистемы, хвойных лесов, прерии и пустыни США использовали значения ПАА в интервале 1.05-1.42 [Bailey et al., 2002]. В наших экспериментах для расчета этого соотношения использовали только варианты с ПАА, не отличающиеся от единицы более чем на 5%.

При определении ПАА учитывают концентрацию стрептомицина, обеспечивающую наибольшее подавление СИД при отдельном внесении и в комбинации с циклогексимидом (табл. 6). Так, в точках 1, 2 и 5 концентрация бактерицида, обеспечивающая наибольшее подавление СИД при его отдельном внесении и «удовлетворительном» значении ПАА, совпадала с таковой при совместном. Однако в точках 3 и 4 с низким рН удовлетворительное значение ПАА было достигнуто при комбинации

антибиотиков, в которой концентрация стрептомицина была меньше, чем при его отдельном внесении. Это обусловлено тем, что концентрация стрептомицина в почве, обеспечивающая наибольшее подавление СИД, зависит от рН почвенной среды (рис. 15).

Таблица 6. Концентрация стрептомицина (С) и циклогексимида (Ц), обеспечивающая наибольшее подавление субстрат-индуцированного дыхания (СИД), и значение коэффициента перекрывания активностей антибиотиков (ПАА) почвы разных точек катены

Точка катены	С ^{**}	С + Ц	Подавление СИД, %	ПАА
	мг / г почвы			
1	0.125	0.125 + 40 ^{***}	39 ± 3	1.05
	0.25	0.25 + 40 ^{***}	36 ± 3	1.22
	0.25	0.5 + 40 ^{***}	34 ± 8	1.36
	0.5	0.5 + 40	23 ± 3	0.71
	0.5	1 + 40	24 ± 15	0.68
2	16	2 + 40	45 ± 3	1.10
	То же	4 + 40	40 ± 2	1.21
	"	8 + 40	45 ± 2	1.10
	"	16 + 40	46 ± 5	1.06
3 [*]	32	8 + 30	46 ± 10	1.34
	То же	16 + 30	60 ± 5	1.02
	"	32 + 30	54 ± 2	1.12
4	8	1 + 30	25 ± 14	1.55
	8	2 + 30	40 ± 2	0.96
	8	4 + 30	42 ± 13	0.93
	16	8 + 30	45 ± 9	1.73
	16	16 + 30	51 ± 9	1.53
	32	32 + 30	48 ± 6	1.56
5 [*]	0.0625	0.0625 + 20	75 ± 4	0.92
	0.125	0.125 + 20	74 ± 3	1.00
	0.125	0.25 + 20	73 ± 4	1.02

Примечание: * Циклогексимид с тальком (1 : 1). ** Стрептомицин внесен отдельно. *** Навеска почвы 0.5 г. ПАА=1 ± 5% (выделено курсивом).

В почве разных частей исследуемого ландшафта подавление СИД антибиотиками при удовлетворительном значении ПАА составило 23-75%. Другие авторы отмечали подавление СИД почвы комбинацией антибиотиков на 29-59% [Bailey et al., 2002]. Поэтому степень подавления СИД антибиотиками в наших экспериментах можно считать удовлетворительной. Кроме того, «удовлетворительное» значение ПАА соответствовало, как правило, более высокому подавлению СИД в почве каждой точки катены.

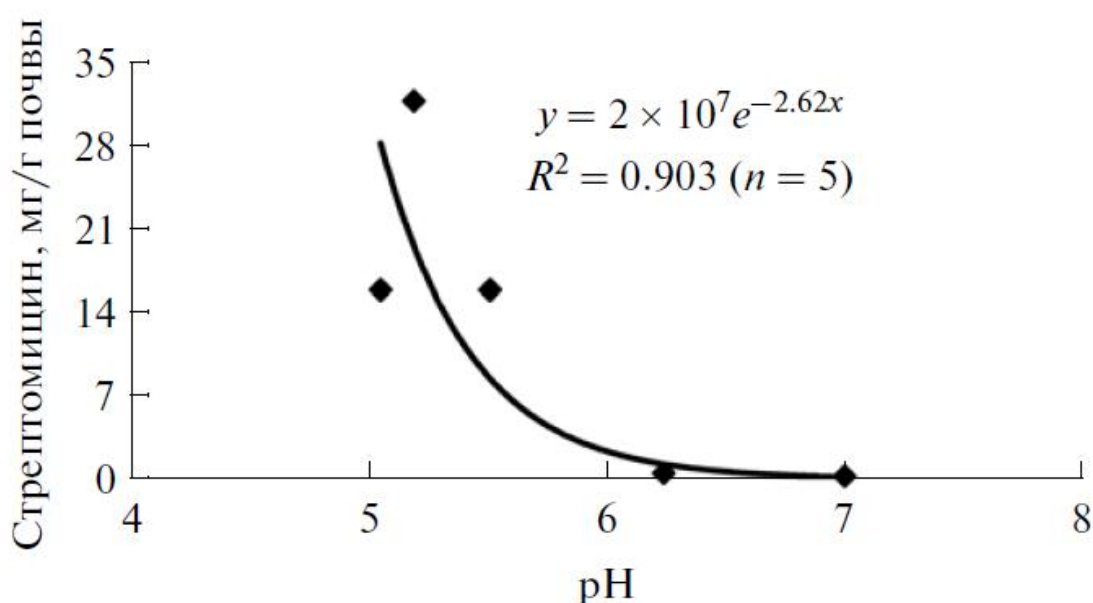


Рис. 15. Зависимость между pH почвы и концентрацией стрептомицина, обеспечивающей наибольшее подавление СИД в почве разных точек катены.

Таким образом, разделение грибного и бактериального вклада в общее СИД должно сопровождаться соблюдением ряда условий, нацеленных на наибольшее подавление СИД антибиотиками (отдельное и совместное внесение), а также значением ПАА, не отличающимся более чем на 5% от единицы. Кроме того, для некоторых почв, например с кислым pH, удовлетворительное значение ПАА достигается уменьшением концентрации бактерицида при совместном внесении антибиотиков по сравнению с таковым при отдельном внесении.

3.2.2. ДОЛЯ ГРИБНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПОНЕНТОВ БИОМАССЫ В ПОЧВАХ КАТЕНЫ

Для почв разных частей склонового ландшафта с учетом установленных коэффициентов перекрытия активностей антибиотиков (ПАА) было рассчитано соотношение грибов и бактерий в почве (рис. 16). Вклад грибов в общее СИД был доминирующим (82-97%), а бактерий – всего 9-20% от суммарного. В транзитной и транзитно-аккумулятивной частях ландшафта вклад грибов в общее дыхание был меньше (82-87%), чем в автономной и аккумулятивной точках катены (91-97%). Отношение грибы / бактерии в почве исследованных точек составило 4.1-12.1, причем в точках 2 и 3 оно было наименьшим (6.6 и 4.1 соответственно), а в точках 1, 4 и 5 – наибольшим (12.1, 9.7 и 10.1 соответственно).

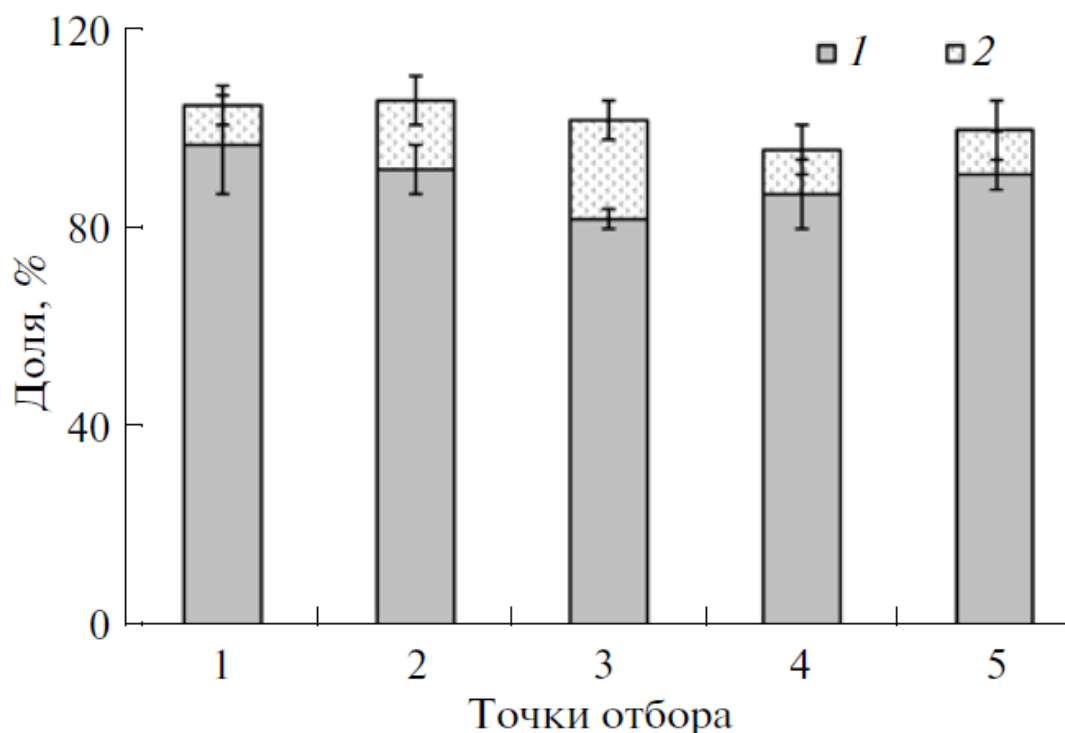


Рис. 16. Доля грибов (1) и бактерий (2) в почве разных точек катены бассейна р. Ока. Точки отбора 1-5 соответствуют автономной, транзитной, транзитной, транзитно-аккумулятивной и аккумулятивной частям ландшафта.

Таблица 7. Корреляционная матрица параметров почв (0-10 см) разных частей ландшафта бассейна р. Ока

Показатели	C _{орг}	pH	C / N	C _{мик}	БД	qCO ₂	Г, %	Б, %	Г*	Б*	N _{общ}	C _{мик} /C _{орг}	Г/Б
C _{орг}	1.00												
pH	0.74	1.00											
C / N	-0.04	-0.01	100										
C _{мик}	0.44	0.76	-0.37	1.00									
БД	-0.07	-0.54	0.41	-0.38	1.00								
qCO ₂	-0.23	-0.69	0.52	-0.67	0.93	1.00							
Г, %	0.00	0.59	-0.01	0.82	-0.36	-0.57	1.00						
Б, %	-0.23	-0.52	-0.59	-0.51	-0.17	0.00	-0.72	1.00					
Г*	0.35	0.75	-0.31	0.99	-0.40	-0.69	0.89	-0.56	1.00				
Б*	-0.03	-0.19	-0.96	0.10	-0.31	-0.35	-0.27	0.79	0.03	1.00			
N _{общ}	0.97	0.71	-0.26	0.52	-0.14	-0.32	0.01	-0.10	0.41	0.19	1.00		
C _{мик} / C _{орг}	-0.62	-0.02	-0.22	0.43	-0.32	-0.40	0.75	-0.26	0.52	0.04	-0.54	1.00	
Г / Б	0.15	0.57	0.61	0.48	-0.04	-0.15	0.77	-0.97	0.56	-0.81	0.01	0.34	1.00

* Содержание биомассы грибов (Г) и бактерий (Б), мкг/г почвы. Жирный курсив – достоверно значимо при $p \leq 0.05$.

Была оценена корреляционная взаимосвязь между химическими ($C_{\text{орг}}$, $N_{\text{общ}}$, pH, C/N) и микробиологическими ($C_{\text{мик}}$, БД, $q\text{CO}_2$, $C_{\text{мик}}/C_{\text{орг}}$, Г/Б) параметрами почв разных частей изученного ландшафта (табл. 7). Оказалось, что структура микробной биомассы (Г/Б) тесно и достоверно коррелировала со значением C/N почв и их pH ($r = 0.61$ и 0.57 соответственно), а абсолютное содержание грибов (мкг С/г) – с общим содержанием $C_{\text{мик}}$, pH почвы и $q\text{CO}_2$ ($r = 0.99$, 0.75 и -0.69 соответственно).

Другими авторами было показано влияние pH на отношение Г/Б почвы под лесом [Väätä, Anderson, 2003; Hogberg et al., 2007] и пашней [Rousk et al., 2009]. Считается, что доля грибов возрастает в кислых почвах [Hogberg et al., 2007; Rousk et al., 2009], однако есть сведения, что изменение pH почвы может и не влиять на содержание грибов [Väätä, Anderson, 2003; Hogberg et al., 2007; Rousk et al., 2009]. Последнее утверждение связано с тем, что оптимум pH для роста почвенных грибов очень широк по сравнению с бактериями [Strickland, Rousk, 2010].

В литературе имеется много сведений о взаимосвязи содержания грибного компонента, а значит структуры микробного сообщества, и соотношения C/N в почве и других субстратах [Hogberg et al., 2007]. Показано, что обилие грибных таксонов наиболее значимо связано с отношением C/N и содержанием фосфора в почве по сравнению с другими эдафическими факторами [Lauber et al., 2008]. Чем шире отношение C/N в почве, тем больше в ней содержание грибов [Ingham, Horton, 1987]. В почве изученной нами катены наименьшая доля грибов (Г/Б = 6.6 и 4.1) обнаружена для точек 2 и 3, в которых обнаружено низкое отношение C/N (9.0 и 9.8 соответственно).

Итак, в микробном сообществе почв разных частей ландшафта, образующих катену, под травянистой и древесной растительностью установлено преобладание грибного компонента над бактериальным. Содержание грибов в почве контролируется ее химическими свойствами и главным образом отношением C/N и значением pH.

3.2.3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определяли структуру микробного сообщества (соотношение грибы/бактерии) методом селективного ингибирования (СИ) антибиотиками (стрептомицина сульфат, циклогексимид) субстрат-индуцированного дыхания (СИД) в серой лесной почве автономной, транзитной, транзитно-аккумулятивной и аккумулятивной (аллювиально-луговая почва) частей склонового ландшафта правобережья р. Оки (около г. Пущино Московской обл.), представленного залежью, мелколиственным лесом, ельником и лугом. Для почвы каждой части ландшафта экспериментально подобраны концентрации бактерицида и фунгицида, обеспечивающие наибольшее подавление СИД почвы при их отдельном и совместном внесении. Обнаружена доминирующая роль грибов, вклад которых составил 82-97% в общее СИД. Показана зависимость между структурой микробного сообщества и отношением C/N и рН почвы. Наиболее высокое отношение Г/Б до 10-12 было отмечено для автономной и аккумулятивной позиций склонового ландшафта, почв которых характеризуются рН 6-7.

3.3. СТРУКТУРА МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОКАРИОТНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧВ

Прокариотный комплекс почвенного сообщества включает в себя два домена: бактерии (Bacteria) и археи (Archaea). В отличие от бактерий, участие которых в функционировании почвенных экосистем общеизвестно, лишь недавно окончательно доказана многочисленность и повсеместность присутствия в почвах архей [Nicol et al., 2006; Ochsenreiter et al., 2003], их участие в циклах углерода и азота [He et al., 2007; Leininger et al., 2006]. Численность и активность архей в почве зависит от таких факторов, как наличие растительности [Rooney-Varga et al., 2007], доминирующий трофический статус [Nicol et al., 2004], величина pH почвенной среды [He et al., 2007; Kemnitz et al., 2007], глубина почвенного профиля [Hansel et al., 2008] и других условий.

Археи и бактерии выступают конкурентами за ресурсы, как, например, в случае окисления аммония [He et al., 2012; Walker et al., 2010]. В почве с кислой реакцией среды, в которой доступность аммония резко ограничивается, археи могут быть более конкурентоспособными, поскольку имеют ряд преимуществ по сравнению с аммоний-окисляющими бактериями [He et al., 2012]. Большее сродство к аммонию, позволяет аммоний-окисляющим археям использовать низкие концентрации аммония при ограниченных объемах субстрата [Martens-Habbena et al., 2009]. Выдвинута гипотеза, что в целях успешной конкуренции с бактериями, у архей сформировались специфические катаболические пути, позволяющие использовать ресурсы в более широком интервале экологических условий. Например, активность окисления аммония представителями филогенетической группы *Thaumarchaeota* значительно выше в условиях низких величин pH, чем у бактерий [Valentine, 2007]. Поэтому по соотношению численности архей и бактерий можно, по-видимому, судить как о степени приспособленности этих двух доменов к условиям среды, так и об их взаимной конкуренции за экологические ниши.

Наряду с классическими методами определения численности и биомассы прокариот [Полянская, Звягинцев, 2005], ведущее значение при изучении структуры прокариотного комплекса почв приобрели молекулярно-биологические методы. Большинство такого рода методов базируется на экстракции из почвы ДНК, однако в этом случае устанавливается общее содержание тех или иных микроорганизмов, т.е. помимо активных клеток, учитываются дормантные формы, а так же мертвые клетки [Bakken, Frostegård, 2006]. РНК-методы более чувствительны и позволяют вычленять из всего микробного сообщества метаболически активный микробный комплекс [Mikkonen et al., 2014] и, таким образом, более адекватно отображают влияние экологических условий среды. Метод *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) совмещает возможности идентификации, визуализации, а также определения численности отдельных филогенетических и функциональных групп архей и бактерий в различных природных субстратах, в том числе в почвах [Amann, Ludwig, 2000; Eickhorst, Tippkötter, 2008; Schmidt, Eickhorst, 2014]. Данный метод позволяет количественно определять живые метаболически активные клетки почвенного микробного сообщества [Манучарова, 2008; Манучарова и др., 2011; Ярославцев и др., 2009] благодаря использованию молекулярных проб, способных гибридизоваться исключительно с комплементарной последовательностью нуклеотидов рРНК, наличие которой в клетках свидетельствует об их росте и способности к делению [Molin, Givskov, 1999].

Задачами данной части работы было 1) выявить особенности распределения метаболически активных клеток архей и бактерий в разных типах почв, контрастно отличающихся по свойствам и размерам общей микробной биомассы, 2) оценить варьирование соотношений бактерии/археи в разных слоях почв.

3.3.1. СОДЕРЖАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АРХЕЙ И БАКТЕРИЙ В ПРОФИЛЕ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ, ЧЕРНОЗЕМЕ И БУРОЙ ПОЛУПУСТЫННОЙ ПОЧВЕ

Количество метаболически активных клеток бактерий в верхнем слое гумусового горизонта варьировало от 1.92×10^8 до 7.05×10^8 , отчетливо уменьшаясь в следующем ряду почв: аллювиально-луговая (аккумулятивная часть склонового ландшафта) > серая лесная (транзитная часть) > серая лесная (автономная часть) > чернозем типичный (лесополоса) > чернозем типичный (пашня) > бурая полупустынная (целина) > бурая полупустынная (пашня). Число активных клеток архей было на порядок меньше (от 3.3×10^7 до 1.67×10^8), чем бактерий, а последовательность уменьшения в ряду почв была иной: чернозем типичный (лесополоса) = аллювиально-луговая (аккумулятивная часть склонового ландшафта) > серая лесная (транзитная часть) > серая лесная (автономная часть) > чернозем типичный (пашня) > бурая полупустынная (пашня) > бурая полупустынная (целина). Меньшее число активных клеток бактерий и отчасти архей в типичном черноземе по сравнению с серой лесной почвой могло быть обусловлено недостаточным снабжением микроорганизмов органическим углеродом в черноземе из-за большей защищенности органического вещества, так и частичным недоучетом клеток из-за сложности их отделения от глинистых частиц и гуминовых веществ.

Наибольшее количество бактерий и архей в почвах склонового ландшафта соответствовало верхнему гумусовому горизонту А (рис. 17 и 18). В горизонтах АВ и В серой лесной почвы автономного и транзитного участков количество бактерий было соответственно в 3.1-3.8 и 5.2-6.6 раз меньше, чем в горизонте А.

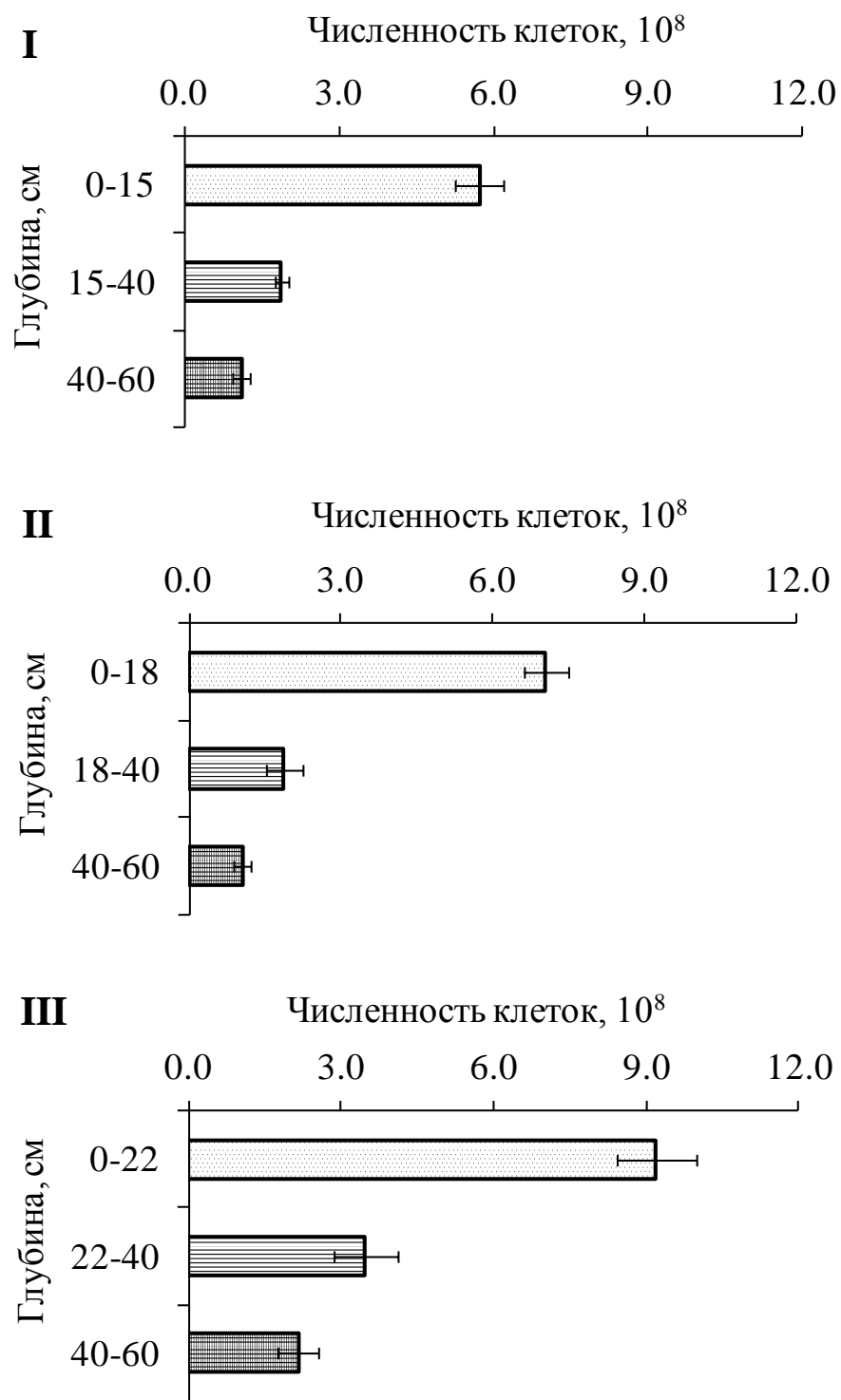


Рис. 17. Распределение метаболически активных клеток бактерий в почвах склонового ландшафта. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

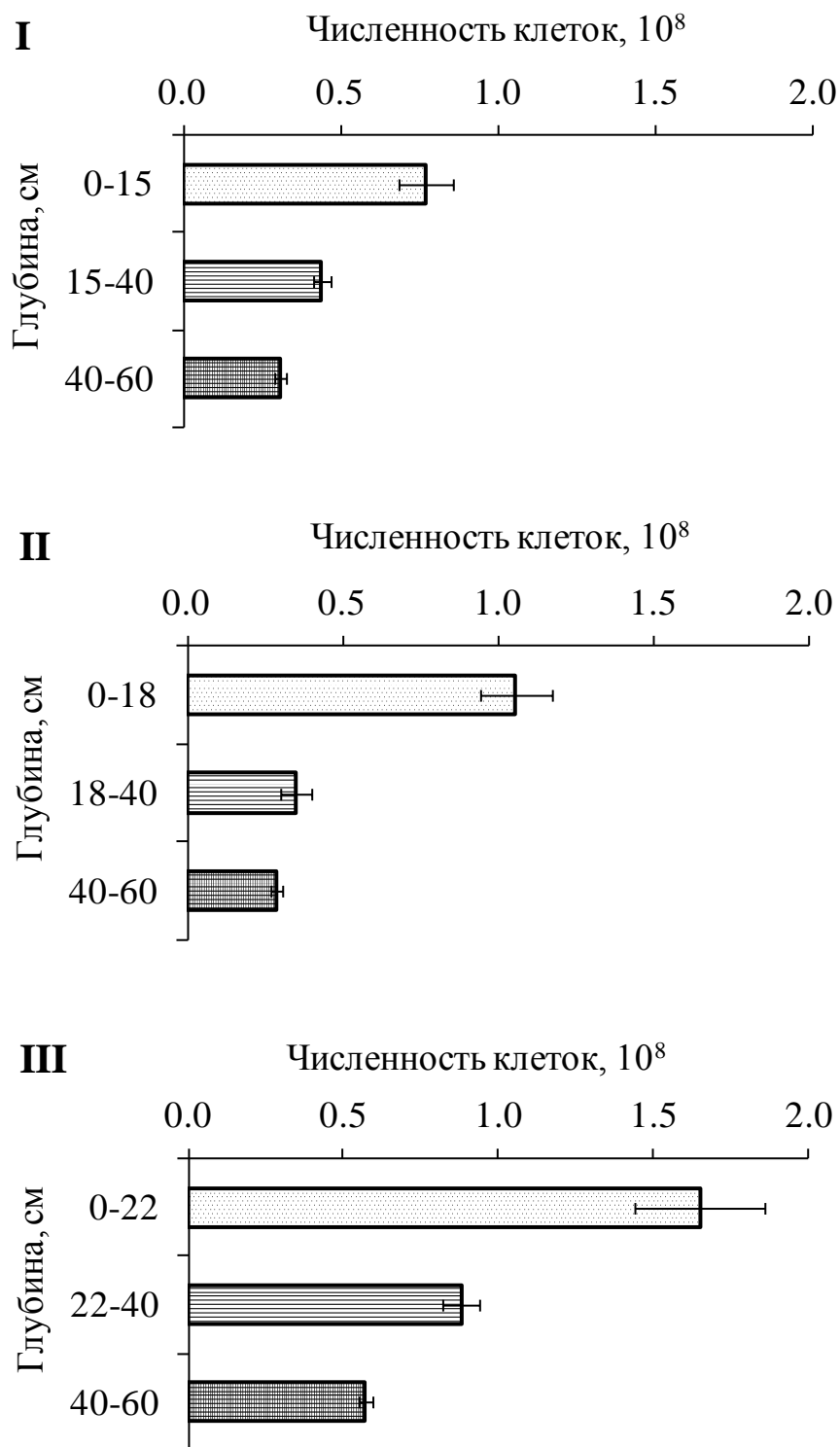


Рис. 18. Распределение метаболически активных клеток архей в почвах склонового ландшафта. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

В аллювиально-луговой почве аккумулятивной части ландшафта сохранялся вертикальный градиент распределения бактерий, но во всех выделенных горизонтах содержалось больше активных клеток по сравнению с серой лесной почвой. Убыль количества клеток архей с глубиной была менее резкой, чем бактерий: в серой лесной почве в среднем в 2.4 (горизонт АВ) и 3.1 (горизонт В) раза, а в аллювиально-луговой – в 1.9 и 2.9 раза соответственно. Численность метаболически активных клеток архей в черноземе под лесополосой снижалась вниз по профилю почвы от 1.67×10^8 до 7.78×10^7 клеток $г^{-1}$ почвы. Обращает внимание двукратное уменьшение численности архей при переходе от верхнего слоя горизонта А1 (0-18 см) к более глубокому слою (18-45 см) этого горизонта (рис. 19).

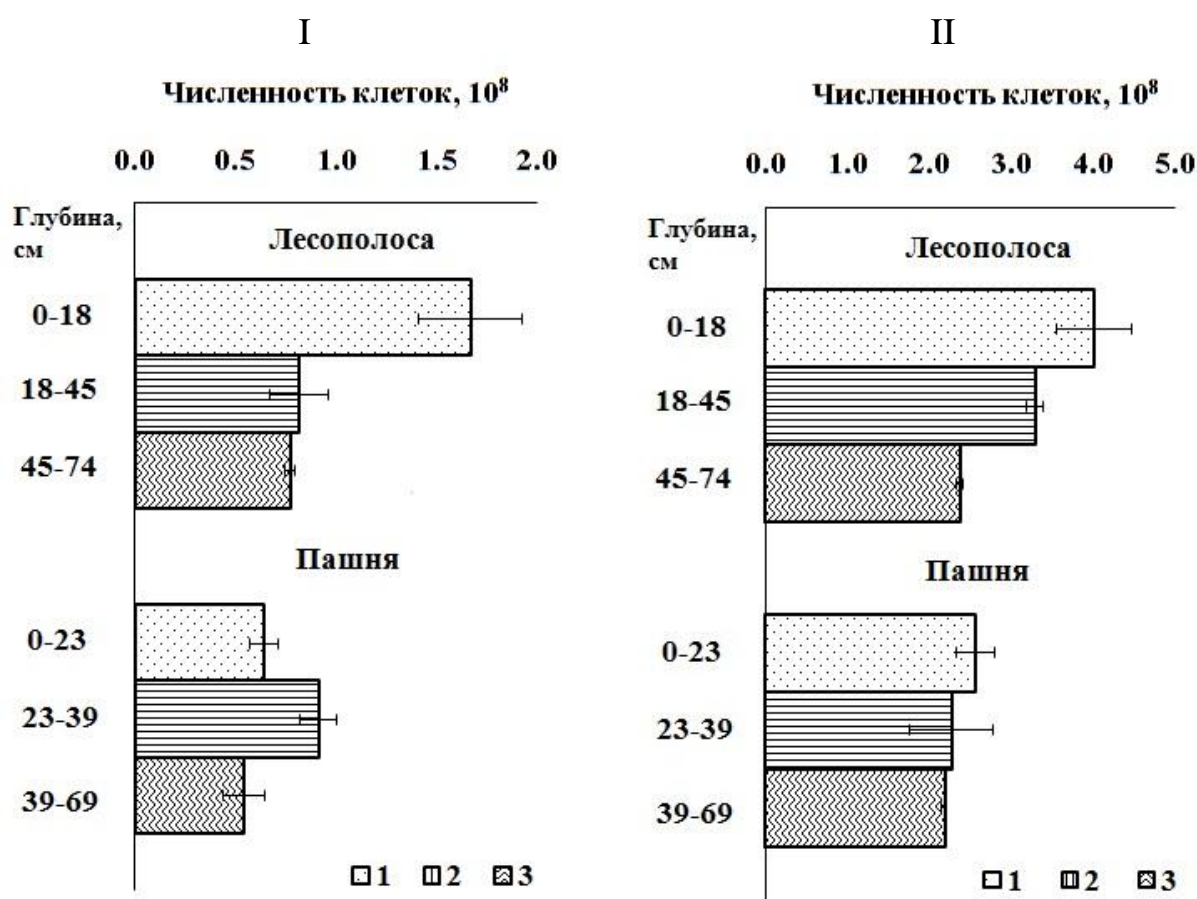


Рис. 19. Распределение метаболически активных клеток архей (I) и бактерий (II) в черноземе типичном под лесополосой и пашней). 1 – А1 (0–18 см), 2 – А1 (18–45 см), 3 – АВ (45–74 см) (лесополоса) и Апах (0–23 см), А1 (23–39 см) и АВ (39–69 см) (пашня) соответственно.

В черноземе под пашней имело место несколько иное распределение архей по профилю. Численность клеток в верхнем пахотном горизонте Апах

составляла 6.46×10^7 клеток г^{-1} почвы и была даже ниже, чем в более глубоком подпахотном слое (21-39 см) горизонте А1 (рис. 19). В целом, численность архей в верхнем горизонте чернозема под пашней была в 2.5 раза меньше, чем под лесополосой, а более глубокие горизонты необрабатываемого и пахотного чернозема имели близкие количества метаболически активных клеток.

Численность метаболически активных клеток бактерий в черноземе типичном колебалась от 3.96×10^8 до 2.38×10^8 клеток г^{-1} под лесом и от 2.58×10^8 до 2.18×10^8 клеток г^{-1} под пашней (рис. 19). В почве под лесополосой численность активных клеток бактерий экспоненциально снижалась с глубиной. В результате агрогенных воздействий в почве пашни наблюдалось значительное снижение количества бактерий в верхнем горизонте по сравнению с лесополосой, в результате чего достоверных различий по численности бактерий в разных горизонтах обнаружено не было.

Таким образом, в результате систематических обработок численность метаболически активных клеток архей в верхнем горизонте типичного чернозема снизилась в 2.6 раз по сравнению с многолетней лесополосой, а бактерий – в 1.5 раза (рис. 19). В отличие от пахотного участка, на котором почва подвергается постоянным нарушающим воздействиям, почва под лесополосой имеет ненарушенное агрегатное сложение, более стабильное увлажнение и сложившуюся структуру микробного сообщества. Кроме того, при сопоставлении химических показателей почв двух экосистем можно заметить, что постоянная обработка чернозема привела к значительному обеднению верхнего горизонта как $C_{\text{орг}}$ (с 4.65 до 3.61% от массы почвы), так и $N_{\text{общ}}$ (с 0.35 до 0.28% от массы почвы) (табл. 3), содержание в почве которых могло быть ключевым фактором поддержания клеток с активным метаболизмом. Таким образом, сельскохозяйственное использование чернозема типичного сопровождается падением численности как архей, так и бактерий, но бактерии, по-видимому, более устойчивы к агрогенным воздействиям.

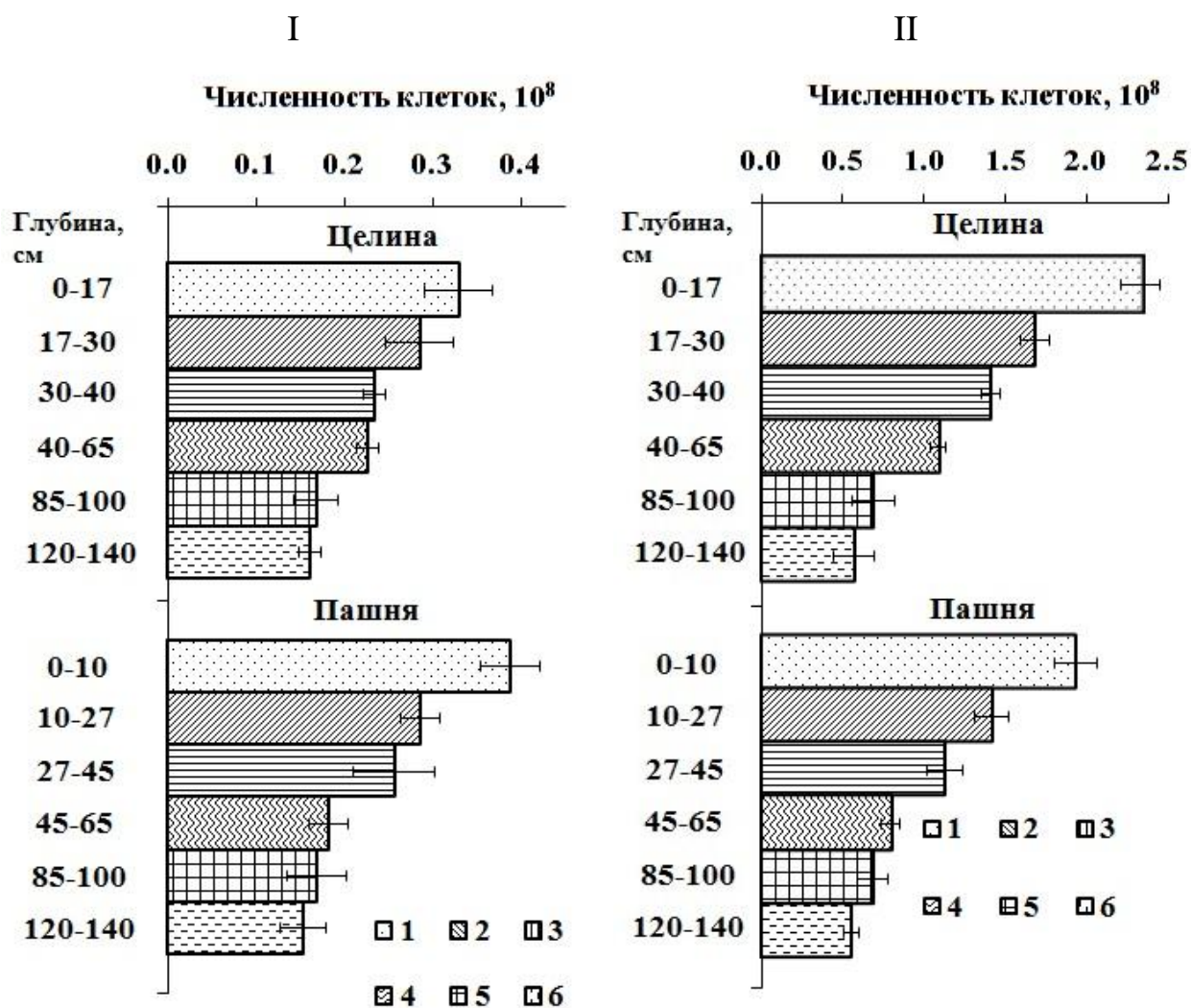


Рис. 20. Распределение метаболически активных клеток архей (I) и бактерий (II) в бурой полупустынной почве целины и пашни (II). Цифрами обозначены горизонты: 1 – А, 2 – АВ, 3 – В, 4 – ВС, 5 – С1, 6 – С2 (целина) и Апак, АВпак, В, ВС, С1, С2 (пашня) соответственно.

Аналогичные сравнения были проведены для разных горизонтов бурой полупустынной почвы аридной зоны климата, залегающей под целинным разнотравьем и пашней. Численность метаболически активных клеток представителей обоих доменов экспоненциально уменьшалась вниз по профилю (рис. 20). Численность архей с глубиной снижалась с 3.9×10^7 до 1.5×10^7 клеток $г^{-1}$ почвы, бактерий – с 2.34×10^8 до 6.0×10^7 $г^{-1}$ почвы. Достоверные изменения численности активных клеток в почве агроэкосистемы проявлялись до глубины 30-40 см (пахотный и подпахотный горизонты), а в нижележащих слоях профилях их численность была практически одинаковой. Как и в черноземе, сельскохозяйственное

использование бурой полупустынной почвы приводило к уменьшению численности бактерий по сравнению с целиной на 20%, однако в случае архей подобного снижения не наблюдалось (рис. 20). Более того, в самом верхнем горизонте бурой полупустынной почвы под пашней численность метаболически активных архей даже было больше, чем под естественной растительностью.

В других работах отмечалось негативное воздействие сельскохозяйственного использования земель на общую численность бактерий, определяемую на основе ДНК-методов [Cao et al., 2012; Wallenius et al., 2011]. Подобный эффект проявляется, судя по нашим данным, и для метаболически активных бактерий в условиях двух типов почв, залегающих в разных региональных биомах. Однако, влияние агрогенной нагрузки на архей проявляется неоднозначно: сельскохозяйственное использование может приводить как к снижению их численности, так и не оказывать никакого значимого эффекта [Cao et al., 2012; Lupatini et al., 2013]. Можно предположить, что численность архей и бактерий определяется не столько самим фактом наличия агрогенной нагрузки, а тем, какие экологические и почвенные параметры при этом изменяются, и насколько существенно их изменение.

3.3.2. ЗАВИСИМОСТЬ ВНУТРИПРОФИЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АРХЕЙ И БАКТЕРИЙ ОТ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЧВЫ

Несмотря на то, что содержание микробной биомассы в почве экспоненциально уменьшается с глубиной [Blume et al., 2002; Hartmann et al., 2009], в нижних горизонтах могут оставаться активные клетки, как бактерий, так и архей [Richter, Markewitz, 1995]. Ранее было показано, что в аэробных условиях в разных горизонтах профиля чернозема развиваются все группы микроорганизмов (грибы, бактерии, в том числе актиномицеты), тогда как в анаэробных условиях в нижнем слое горизонта А и в горизонте В почти не отмечается развития мицелия грибов, бактерий и актиномицетов [Полянская

и др., 2010]. Изменения в численности и структуре микробных сообществ почв с увеличением глубины обусловлены разными физическими и химическими свойствами в пределах почвенного профиля. Нижние слои почвенного профиля существенно отличаются от верхнего гумусового горизонта по содержанию органического вещества, реакции среды, гранулометрическому составу, степени аэрации и влажности. Как следствие, активности архей и бактерий могут сильно варьировать вниз по профилю.

Сопоставляя значения содержания органического вещества с численностью активных клеток архей и бактерий в разных горизонтах почв естественных и сельскохозяйственных экосистем, были обнаружены схожие зависимости. Это говорит о ведущей роли органического вещества в поддержании активного состояния почвенных прокариотов и указывает на их участие в процессах оборачиваемости углерода и азота в почве. Так же как и содержание органического вещества, численность активных клеток увеличивалась от автономной части ландшафта к аккумулятивной и снижалась от верхних горизонтов к нижним (табл. 2, рис. 17, 18). В верхнем горизонте чернозема пашни содержалось практически в полтора раза меньше $C_{орг}$ по сравнению с лесополосой, что очевидно было основной причиной снижения метаболически активных клеток обоих доменов в пахотной почве (табл. 3, рис 19). В нижележащих горизонтах различия по содержанию $C_{орг}$ были не столь существенными, и, как следствие, численности клеток оказались близкими. В бурой полупустынной почве содержание органического вещества снижалось с глубиной и происходило снижение численности активных клеток вниз по профилю (табл. 3, рис. 20).

В то же время, обогащение углеродом верхнего горизонта под пашней практически нивелировало негативный эффект агрогенных воздействий и даже, как уже было упомянуто выше, способствовало повышению численности метаболически активных клеток представителей архей.

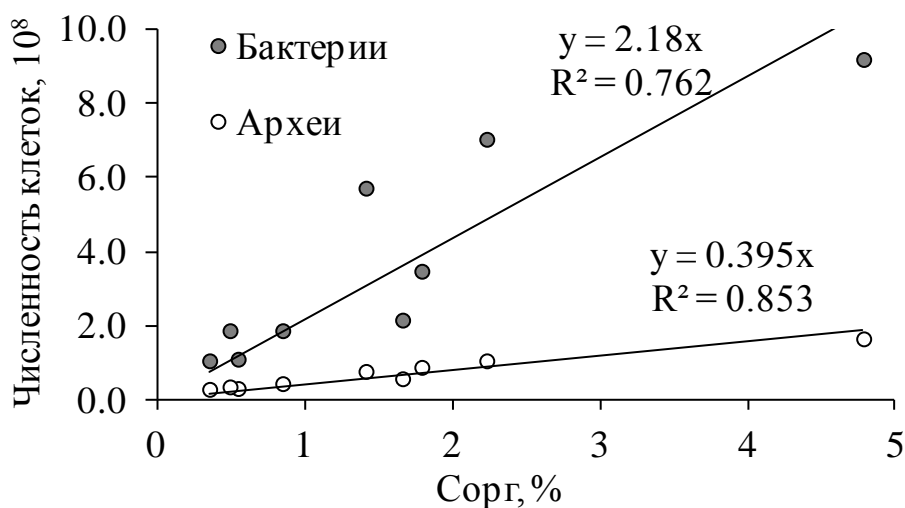


Рис. 21. Зависимость численности метаболически активных клеток бактерий и архей в почвах катены от валового содержания органического вещества.

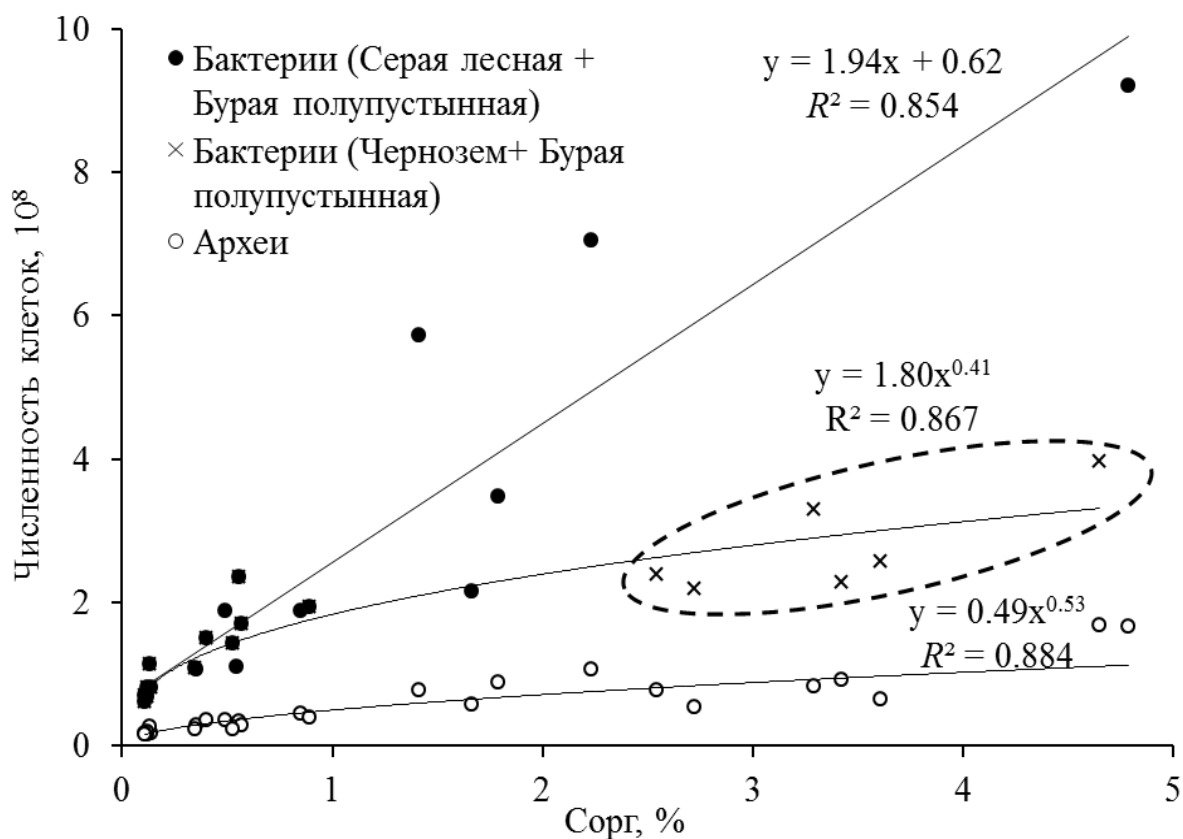


Рис. 22. Изменение численности метаболически активных клеток бактерий и архей в почве в зависимости от содержания органического углерода.

То, что уровень обеспеченности почвы органическим веществом является одним из ключевых факторов формирования почвенного пула прокариот, хорошо подтверждается корреляцией между содержанием $C_{орг}$ в

горизонтах почв катены и численностью активных клеток архей и бактерий (рис. 21). Для массива образцов чернозема типичного и бурой полупустынной почвы также проявлялась тесная корреляция (табл. 8), но со степенной зависимостью (рис. 22). При низком уровне содержания в почве $C_{орг}$ небольшое увеличение его содержания приводило к значительному росту численности метаболически активных клеток, а при относительно высокой обеспеченности органическим веществом численность клеток мало зависела от увеличения содержания $C_{орг}$ (рис. 22).

Таблица 8. Матрица корреляций между химическими параметрами и численностью бактерий и архей в черноземе типичном и бурой полупустынной почве ($N = 18, P < 0.05$)

Параметр	$C_{орг}$	$N_{общ}$	C:N	pH	$C_{мик}$	Бактерии	Археи
$C_{орг}$	1.00						
$N_{общ}$	1.00	1.00					
C:N	0.90	0.90	1.00				
pH	-0.95	-0.95	-0.81	1.00			
$C_{мик}$	0.95	0.96	0.90	-0.94	1.00		
Бактерии	0.89	0.90	0.89	-0.89	0.95	1.00	
Археи	0.92	0.91	0.79	-0.89	0.90	0.90	1.00

Если сопоставить зависимость числа клеток от содержания $C_{орг}$, вычисленную для массива серой лесной, аллювиально-луговой и бурой полупустынной почв с таковой для чернозема типичного и бурой полупустынной почвы, то можно сделать вывод, что черноземы имеют низкую долю активных микроорганизмов (рис. 22). Еще одной причиной может быть проблемы с десорбцией клеток микроорганизмов с поверхности глинистых частиц, в результате чего мы можем недоучитывать численность клеток.

Для архей зависимость численности метаболически активных клеток от $C_{\text{орг}}$ также была тесной (рис. 21, 22). Однако, коэффициенты регрессии в полученных для бактерий уравнениях оказались в 3.6-5.5 раза больше, чем для архей. Следовательно, содержание органического углерода в почве определяло численность, как архей, так и бактерий. Вместе с тем, полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что по сравнению с археями бактерии гораздо более чувствительны к обеспеченности субстратом и хуже приспособлены к условиям энергетического стресса [Valentine, 2007].

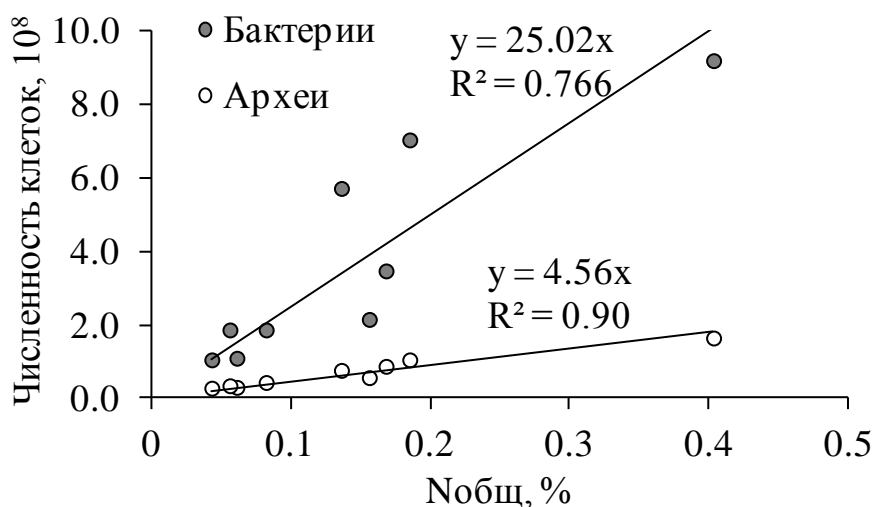


Рис. 23. Зависимость численности метаболически активных клеток бактерий и архей в почвенных горизонтах разных частей склонового ландшафта от валового содержания органического вещества.

Содержание $N_{\text{общ}}$ в почве также тесно коррелировало с численностью архей и бактерий и являлось фактором поддержания их активного метаболизма (табл. 2, рис. 23.). Но поскольку численность обоих доменов достоверно увеличивалось с расширением отношения C/N в почве, количество метаболически активных клеток архей и бактерий определялось главным образом содержанием органического углерода, а не азота (рис. 24).

Между величинами рН и численностью клеток архей и бактерий была получена достоверная отрицательная корреляция (табл. 8). Хотя в предыдущих работах неоднократно подтверждалось влияние рН на оба домена [He et al., 2007; Nicol et al., 2008], наши данные не позволяют

окончательно говорить о роли рН, как основной причине снижения численности клеток архей и бактерий при изменении реакции среды от нейтральной к щелочной.

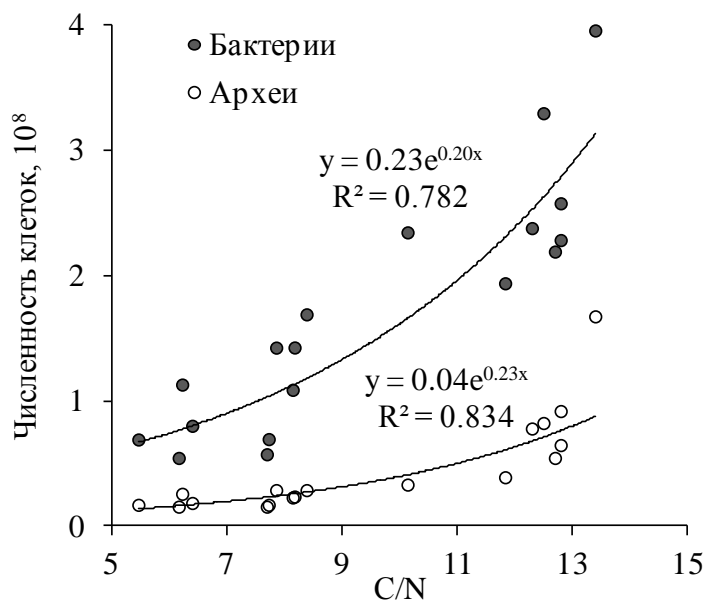


Рис. 24. Зависимость численности активных клеток бактерий и архей в черноземе типичном и бурой полупустынной почве от соотношения C/N в почве.

Это связано с тем, что между величинами рН и $C_{орг}$ также имелась тесная отрицательная зависимость (табл. 8), поскольку богатый органическим веществом чернозем имел нейтральную или слабощелочную реакцию среды, в то время как бурая полупустынная почва с низким содержанием $C_{орг}$ – щелочную и сильнощелочную. Кроме того, с глубиной содержание $C_{орг}$ постепенно снижалось, а рН почвы, наоборот, увеличивалось. Поэтому при изучении влияния рН на численность метаболически активных клеток имело место наложение нескольких факторов. Органическое вещество было ведущим фактором, определяющим количество метаболически активных клеток, как архей, так и бактерий в двух контрастных почвах. Эти результаты согласуются с наличием зависимости между почвенным органическим веществом и активностью ферментов в

почве [Stursová, Baldrian, 2011; Wallenius et al., 2011], продуцентами которых выступают микроорганизмы, прежде всего с активным метаболизмом.

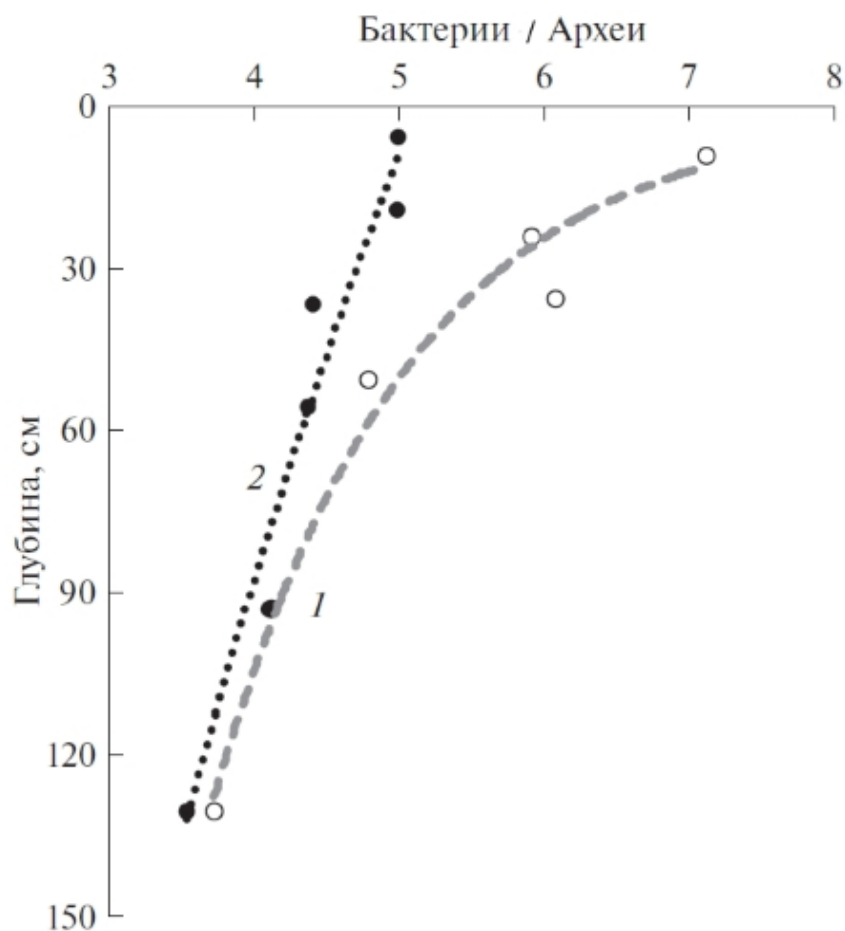


Рис. 25. Соотношение метаболических клеток бактерий и архей в профиле бурой полупустынной почвы под целиной (1) и пашней (2).

Поскольку содержание органического углерода уменьшается с глубиной, а бактерии хуже приспособлены к условиям дефицита углерода по сравнению с археями, мы сравнили соотношения бактерии/археи на разных глубинах бурой полупустынной почвы. Профиль этой почвы представляет идеальный градиент усиления энергетического стресса от верхнего горизонта к нижним, как это видно из распределения C_{org} (табл. 3). В почве целины соотношение бактерии/археи снижалось от 7.1 в верхнем горизонте до 3.7 на глубине 120-140 см, а в почве пашни – от 5 до 3.5 (рис. 25).

Поскольку численность представителей обоих доменов уменьшалась с глубиной, сужение соотношения бактерии/археи говорит о том, что количество бактерий более резко уменьшалось вниз по профилю. Отличие в

величинах соотношения между почвой целины и пашни проявлялось до глубины 40-50 см, а в нижележащих горизонтах величины этих соотношений сравнивались. Причиной более узкого соотношения бактерии/археи в верхнем горизонте пахотной почвы по сравнению с целинной было, во-первых, уменьшение численности бактерий вследствие агрогенной нагрузки, и, во-вторых, увеличение численности архей в горизонте $A_{\text{пах}}$. В черноземе типичном обеих исследуемых экосистем различия между горизонтами по $C_{\text{орг}}$ были менее контрастными, поэтому соотношение бактерии/археи слабо менялось по мере увеличения глубины.

Как и в бурой полупустынной почве, в почвах катены соотношение бактерии/археи также снижалось вниз по профилю (рис. 26), что говорит о возможной универсальности этого соотношения при характеристике внутрипрофильного распределения прокариот. В верхнем горизонте наибольшее соотношение бактерии/археи соответствовало почве автономного участка, а наименьшее – аллювиально-луговой почве аккумулятивного участка (7.4 и 5.6 соответственно). Величины соотношений для трех почв резко уменьшались с глубиной, выравниваясь на глубине ниже 40 см в диапазоне 3.6-3.8.

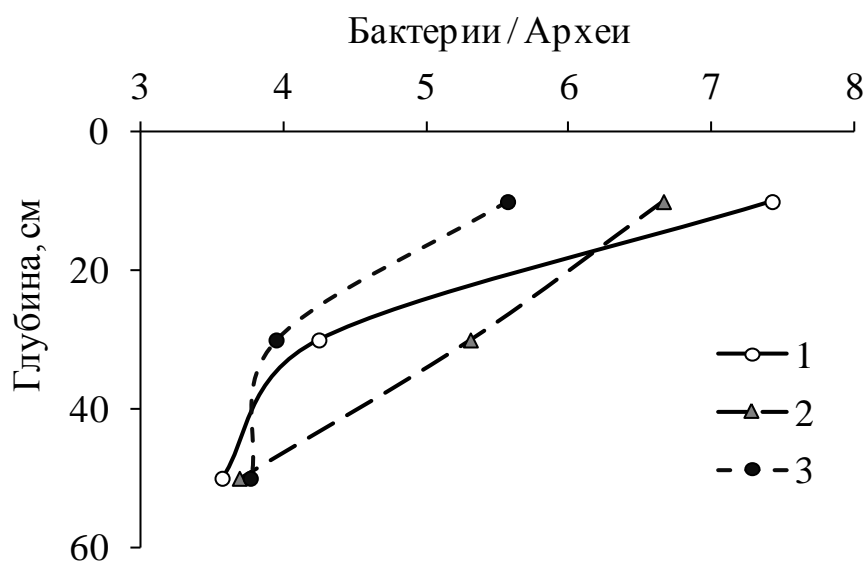


Рис. 26. Соотношение метаболитически активных клеток бактерий и архей в профиле серой лесной автономного (1), серой лесной транзитного (2) и аллювиально-луговой почвы аккумулятивного (3) участков катены.

Нами была рассчитана доля метаболически активных архей в прокариотном комплексе (в % к сумме метаболически активных клеток архей и бактерий). В разных горизонтах типичного чернозема под лесополосой и пашней доля архей составляла 20-30% без какой либо отчетливой зависимости от характера землепользования и глубины залегания. В бурой полупустынной почве доля архей возрастала вниз по профилю с 12 до 21% в целинной почве и с 16 до 22% в пахотной. Увеличение доли архей с глубиной от 12-15 до 21-22% оказалось характерным и для серой лесной и аллювиально-луговой почв катены. Близкие результаты были получены в кислых почвах методом qPCR, где доля генов 16S рРНК архей увеличивалась с глубиной с 12% до 38% [Kemnitz et al., 2007]. Филогенетический анализ структуры микробных сообществ темно-каштановой малоразвитой почвы аридной климатической зоны показал, что доля архей в общем прокариотном комплексе превышала 11% [Сергалиев и др., 2015].

Исходя из того, что содержание органического вещества вносило наибольший вклад в распределение метаболически активных архей и бактерий, мы можем заключить, что соотношение бактерии/археи также определяется уровнем обеспеченности $C_{орг}$, по крайней мере, в случае отчетливого его дефицита в почве. Помимо количественного фактора важную роль может играть качество органического вещества, которое изменяется с глубиной, видоизменяя структуру микробных сообществ [Eilers et al., 2010; Rumpel, Kögel-Knabner, 2011]. Археи способны осуществлять переход на миксотрофный и гетеротрофный метаболизм [Jia, Conrad, 2009; Levicnik-Höfferle et al., 2010], используя при этом широкий спектр углеродных субстратов, в том числе низкого энергетического качества [He et al., 2012]. Подобная трофическая гибкость архей позволяет им не только выживать в олиготрофных условиях глубинных горизонтов, но и поддерживать функциональную активность. Влияние качества органического вещества на распространение архей в разных, в том числе экстремальных

условиях почвенной среды, и их долю в микробном комплексе почв может стать одним из дальнейших векторов в изучении экологии данного домена.

3.3.3. СОДЕРЖАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП В СОСТАВЕ АРХЕЙ В ПРОФИЛЕ ПОЧВ КАТЕНЫ

При исследовании численности и распределения метаболически активных клеток прокариот в почвах разных участков катены были использованы три специфичные олигонуклеотидные пробы на представителей основных групп почвенных архей – эвриархеот, таумархеот и кренархеот.

Прежде всего, обращает на себя внимание близкая друг другу численность таумархеот и кренархеот. Наибольшая численность этих групп была обнаружена в верхнем горизонте транзитного (6.4×10^7 клеток г^{-1}) и аккумулятивного (5.5×10^7 клеток г^{-1}) участков, что было в 3-5 раз больше, чем самом нижнем слое этих почв (рис. 27).

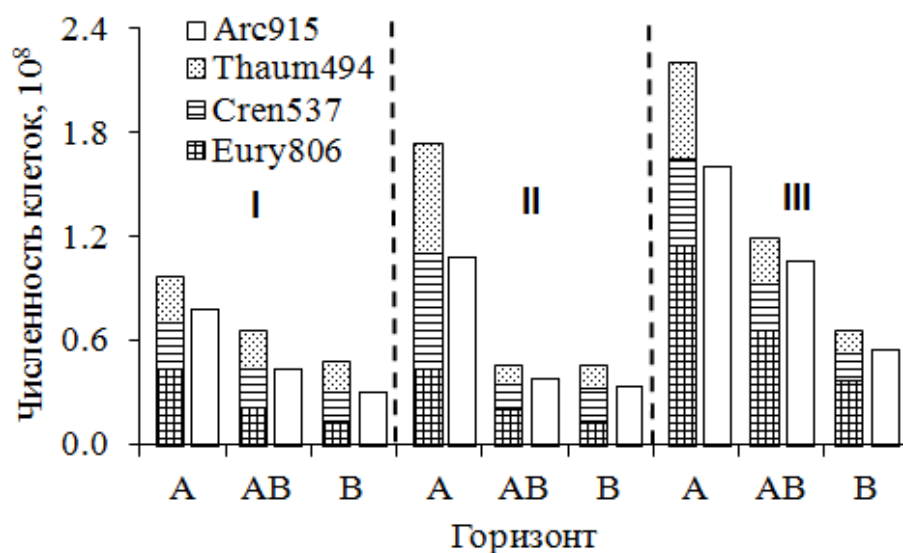


Рис. 27. Распределение метаболически активных клеток архей в почвах склонового ландшафта, гибридизирующихся со специфическими олигонуклеотидными зондами. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

В автономном участке численность таумархеот и кренархеот составляла 2.6×10^7 клеток $г^{-1}$, уменьшаясь с глубиной до 1.8×10^7 клеток $г^{-1}$ (рис. 27). Численность эвриархеот в горизонтах автономного и транзитного участков была примерно одинаковой: 4.4×10^7 клеток $г^{-1}$ почвы в горизонте А, $2.0-2.2 \times 10^7$ клеток $г^{-1}$ почвы в горизонте АВ и 1.3×10^7 клеток $г^{-1}$ почвы в горизонте В. По сравнению с верхними точками катены, в аккумулятивном участке численность эвриархеот возросла 2.5-3 раза, достигнув 1.14×10^8 клеток $г^{-1}$ (рис. 27)

При сопоставлении данных по общей численности архей, полученным пробой Arc915, и суммы количества клеток по олигонуклеотидным пробам для трех групп архей оказалось, что сумма по трем пробам была значительно больше для всех исследуемых почв (рис. 27). Можно заметить, что эта разница между значениями почти полностью совпадала с численностью клеток, полученных с помощью пробы Cren537, а сумма филумов эвриархеот и таумархеот равнялась общему количеству архей.

Причиной этого могла быть неполная детекция общего количество архей пробой Arc915, либо перекрестный эффект проб (детекция представителей другого филума). Поскольку таумархеоты относили и по-прежнему часто относят к мезофильной группе кренархеот из-за их генетической близости, используемые пробы, вероятно, могли детектировать не только кренархеот, но и представителей филума таумархеот [Amano-Sato et al., 2013; Herndl et al., 2005; Teira et al., 2004].

Мы сравнили количества кренархеот и таумархеот, полученные двумя пробами, и они оказались практически полностью идентичными (рис. 28). Следовательно, использование зонда Cren537 детектировало не *Crenarchaeota*, а скорее всего *Thaumarchaeota*. Соответственно, правильнее будет говорить о представителях всего домена Archaea и составляющих его филумах *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota* (рис. 29).

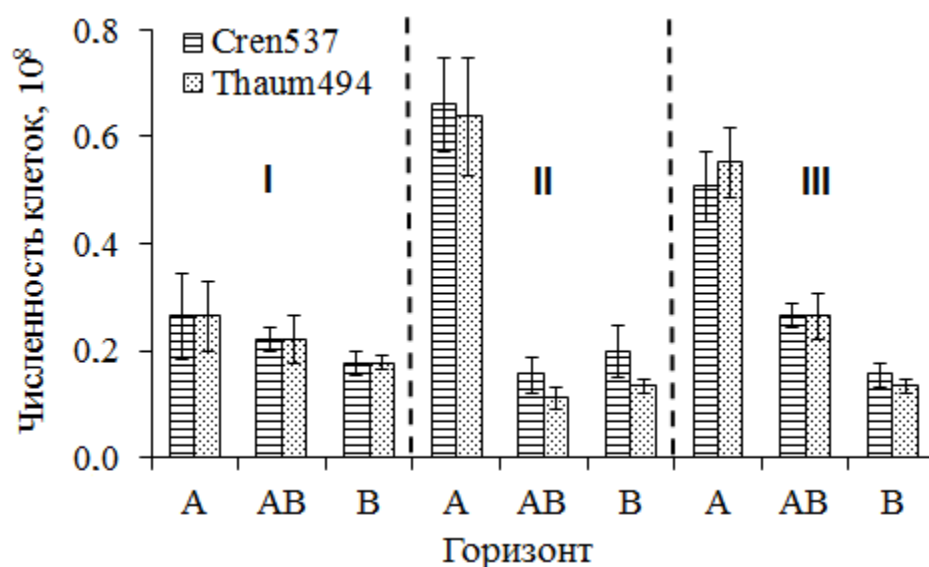


Рис. 28. Сравнение численности метаболически активных клеток архей в почвах склонового ландшафта, гибридизирующихся со специфическими олигонуклеотидными зондами Cren537 и Thaum494. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

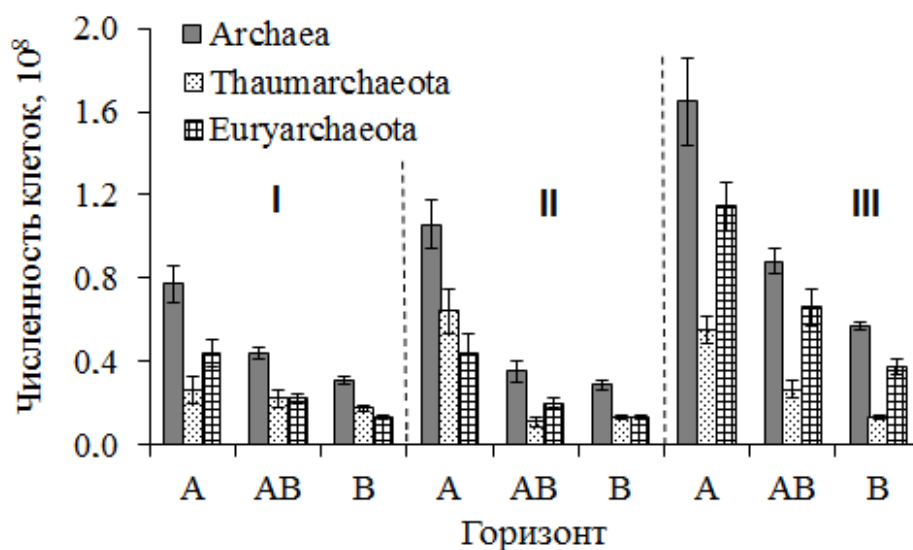


Рис. 29. Распределение метаболически активных клеток архей, таумархеот и эвриархеот в почвах склонового ландшафта. I – серая лесная автономной части ландшафта, II – серая лесная транзитной части, III – аллювиально-луговая почва аккумулятивной части.

За исключением нижнего участка склона, где из-за частого переувлажнения возникали анаэробные условия и потому эвриархеоты были

многочисленны, в аэробных почвах автономного и транзитного участков катены численность эвриархеот и таумархеот была близкой.

Возникает вопрос, означает ли большая численность нуклеотидных последовательностей генов какого-либо организма или таксона, что данный организм метаболически активен и играет роль в процессах, протекающих в почвах? Полученные в нашей работе результаты демонстрируют, что ген 16S рРНК «истинных» кренархеот-экстремофилов детектируется в почвах, но, судя по всему, кренархеоты в почвах метаболически неактивны.

3.3.4. СОПОСТАВЛЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ С КОЛИЧЕСТВОМ ГЕНОВ 16S рРНК

Данные по численности клеток архей и бактерий, полученные методом FISH, были сопоставлены с количеством гена 16S рРНК архей и бактерий, детектируемого с помощью количественной ПЦР – в большей степени для архей и в меньшей мере для бактерий (рис. 30).

Количество гена 16S рРНК почти на порядок превосходило численность активных клеток бактерий, и в несколько раз – клеток архей. В черноземе типичном максимальная численность гена бактерий была обнаружена в верхнем горизонте почвы под лесополосой – 4.76×10^9 гена 16S рРНК $г^{-1}$ почвы. В более глубоких горизонтах количество гена бактерий снижалось до $2.81-2.96 \times 10^9$. В черноземе под пашней, как и в случае с метаболически активными клетками, количество гена бактерий было меньше по сравнению с почвой под лесополосой в 1.7 раза. Лишь в горизонте АВ почвы под лесополосой и в горизонте В почвы под пашней соотношение имели место некоторые различия между численностью метаболически активных клеток бактерий и количеством гена 16S рРНК бактерий (рис. 30). Численность гена 16S рРНК архей в черноземе типичном была меньше примерно на порядок, снижаясь вниз по профилю от 6.37×10^8 до 2.95×10^8 гена 16S рРНК $г^{-1}$ почвы в почве под лесополосой, и от 2.50×10^8 до 1.63×10^8 гена 16S рРНК $г^{-1}$ почвы в почве под пашней (рис. 30).

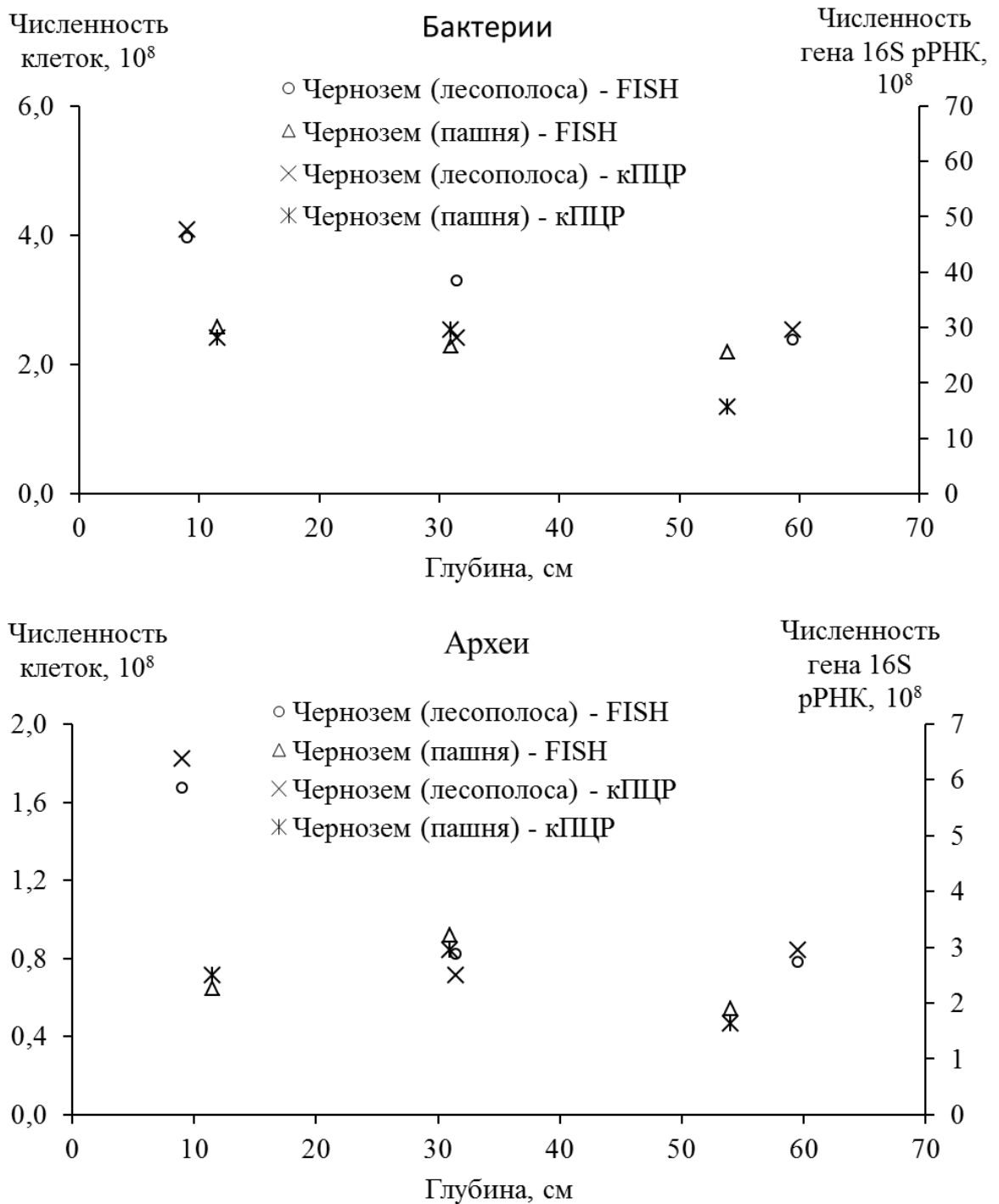


Рис. 30. Сопоставление данных, полученных методами FISH и количественной ПЦР в черноземе типичном. Слева по оси Y количество метаболически активных клеток, справа по оси Y количество гена 16S рРНК.

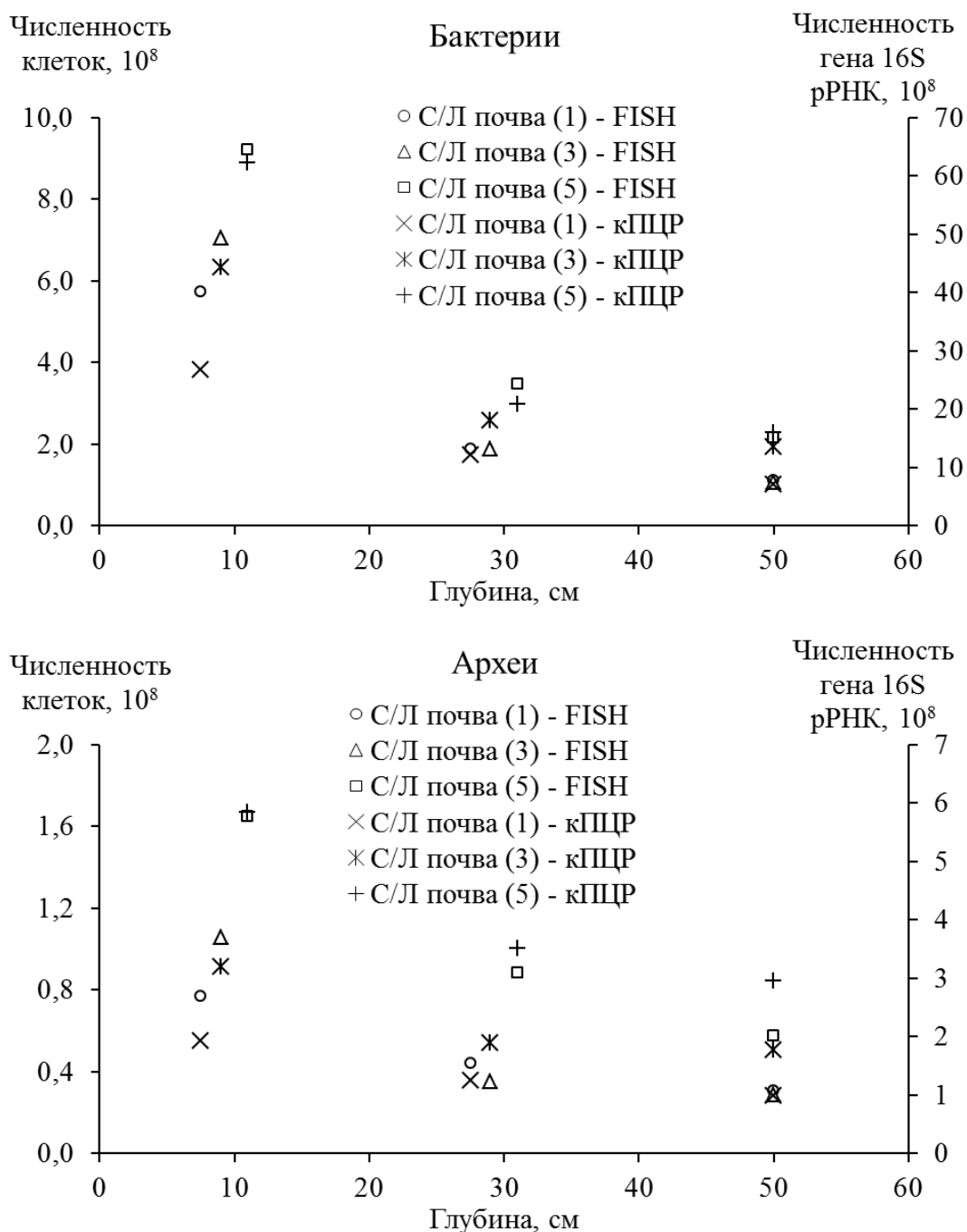


Рис. 31. Сопоставление данных, полученных методами FISH и количественной ПЦР, в серой лесной почве. Слева по оси Y количество метаболически активных клеток, справа по оси Y количество гена 16S рРНК.

Численность гена архей в верхнем горизонте почвы пашни оказалась в 2.5 раза меньше по сравнению с почвой под лесополосой. Количества гена 16S рРНК и метаболически активных клеток архей лучше соответствовали друг другу во всех горизонтах чернозема, чем для бактерий.

В почвах катены, закономерности, полученные методом FISH, также подтверждались методом кПЦР (рис. 31). Численность гена 16S рРНК бактерий в разных горизонтах серой лесной почвы автономного участка варьировала от 2.67×10^9 г⁻¹ почвы до 7.1×10^8 , транзитного участка – от 1.35×10^9 до 4.4×10^9 , а в аллювиально-луговой почве аккумулятивного участка – от 1.6×10^9 до 6.2×10^9 на г почвы (рис. 31). В свою очередь, численность гена архей в почве автономного участка составляла от 1.92×10^8 до 9.88×10^7 , транзитного – от 1.76×10^8 до 3.19×10^8 , а аккумулятивного – от 2.95×10^8 до 5.83×10^8 (рис. 31).

В черноземе количество гена 16S рРНК бактерий превышало численность их метаболически активных клеток в 7.2-12.4 раз, архей – в 3.0-3.8 раз, а в почвах катены (серая лесная и аллювиально-луговая) в 4.7-12.8 и в 2.5-6.1 раз, соответственно. Судя по полученным уравнениям регрессии в среднем на одну метаболическую клетку бактерий и архей, детектируемых методом FISH, в почве приходится соответственно 7 и 3 генов 16S рРНК этих доменов, выявляемых с помощью кПЦР (рис. 32).

Таким образом, данные кПЦР хотя и имеют другой порядок значений, полностью подтверждают закономерности, полученные методом FISH: численность бактерий и архей существенно меньше в верхнем горизонте чернозема пашни по сравнению с черноземом под лесополосой и снижается в профиле всех исследуемых почв с глубиной. Если методом FISH определяется метаболически активная часть прокариотного комплекса, с помощью кПЦР детектируется общий пул прокариот, как живых, так и неактивных и мертвых. Этим и обусловлено значительное превышение значений, полученных методом FISH, измеренными с помощью кПЦР.

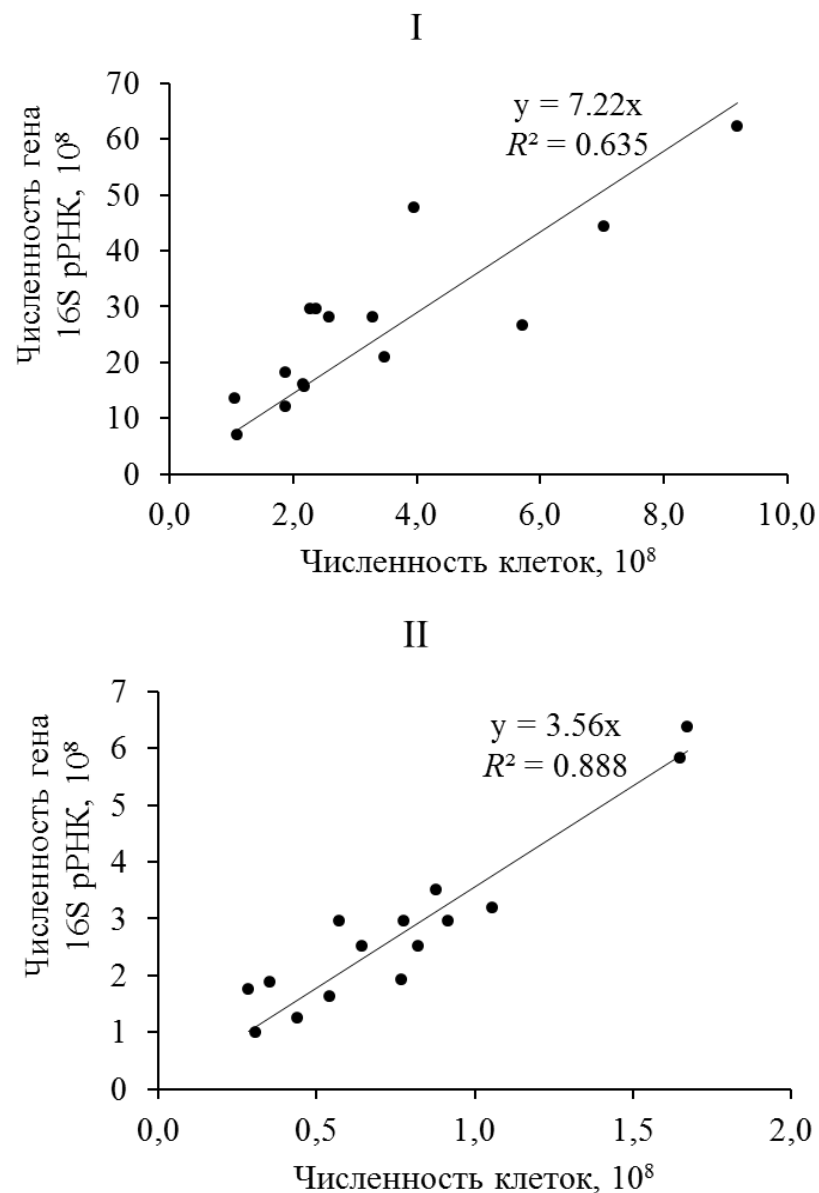


Рис. 32. Связь между численностью метаболически активных клеток и количеством гена 16S рРНК бактерий (I) и архей (II) в исследуемых почвах.

3.3.5. РАЗМЕРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНОЙ БИОМАССЫ АРХЕЙ И БАКТЕРИЙ

Вопрос о соотношении общей и активной биомассы в почве регулярно поднимается в почвенно-микробиологических исследованиях [Alvarez et al., 1998; Nannipieri et al., 2003]. Менее известно о доли активной биомассы прокариот в общей микробной биомассе. Исходя из численности метаболически активных клеток архей и бактерий, нами было рассчитано

содержание углерода активной биомассы бактерий ($C_{\text{бакт}}$), архей ($C_{\text{арх}}$) и прокариот ($C_{\text{прок}}=C_{\text{арх}}+C_{\text{бакт}}$) в целом (табл. 9). Удельная масса микроорганизмов была принята равной 1 г/см^3 , величина сухой биомассы одной клетки – $2 \times 10^{-14} \text{ г.}$, содержание воды в клетках – 80% и углерода в сухой биомассе – 54%. Мицелий актинобактерий не детектировался методом FISH при микроскопировании, поэтому его биомасса не учитывалась.

Таблица 9. Содержание углерода метаболически активной биомассы прокариот и его доля в общей микробной биомассе почв

Горизонт	$C_{\text{мик-ДНК}}$	$C_{\text{бакт}}$	$C_{\text{арх}}$	$C_{\text{прок}}$	$C_{\text{прок}}/C_{\text{мик}}, \%$
Серая лесная и аллювиально-луговая почвы					
А	302	6.18	0.83	7.01	2.32
АВ	94	2.02	0.48	2.50	2.66
В	63	1.19	0.33	1.52	2.42
А	453	7.61	1.14	8.75	1.93
АВ	40	2.02	0.38	2.40	6.07
В	35	1.14	0.31	1.45	4.14
А	840	9.94	1.78	11.72	1.40
АВ	209	3.76	0.95	4.71	2.25
В	186	2.33	0.62	2.95	1.59
Чернозем типичный					
А1	465	4.27	1.81	6.08	1.31
А1	429	3.56	0.89	4.45	1.04
АВ	248	2.57	0.84	3.41	1.37
Апах	318	2.78	0.70	3.48	1.09
А1	275	2.47	0.99	3.46	1.26
АВ	212	2.37	0.59	2.95	1.39
Буряя полупустынная					
А	129	2.53	0.36	2.89	2.24
АВ	127	1.82	0.31	2.13	1.68
В	108	1.54	0.25	1.79	1.66
ВС	57	1.17	0.25	1.42	2.49
С1	21	0.87	0.18	1.05	5.00
С2	16	0.74	0.17	0.91	5.70
Апах	179	2.08	0.42	2.50	1.40
АВпах	126	1.62	0.37	1.99	1.58
В	45	1.22	0.28	1.50	3.33
ВС	19	0.86	0.20	1.06	5.59
С1	15	0.75	0.18	0.93	6.19
С2	12	0.65	0.17	0.82	6.81

В разных горизонтах почв катены в биомассе метаболически активных бактерий содержалось от 1.19 до 9.94 мкг г⁻¹ почвы, в черноземе двух угодий – от 2.37 до 4.27 мкг г⁻¹, а в бурой полупустынной почве целины и пашни – от 0.65 до 2.53 мкг г⁻¹. В свою очередь, содержание углерода биомассы архей варьировало в зависимости от типа почвы, землепользования, глубины профиля от 0.17 до 1.81 мкг г⁻¹ почвы. Таким образом, на долю активной биомассы прокариот приходится от 1 до 6.8% углерода общей микробной биомассы. В нижних горизонтах почвенного профиля в составе общей микробной биомассы содержится больше углерода активной биомассы прокариот, чем в верхних горизонтах, свидетельствуя об увеличении роли архей и бактерий в процессах трансформации углерода и азота, содержащихся в почве.

3.3.6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Серая лесная и аллювиально-луговая почвы катены, чернозем типичный и бурая полупустынная почва естественных и сельскохозяйственных экосистем контрастно различаются по содержанию метаболически активных клеток бактерий и архей. Численность активных клеток бактерий в профиле исследуемых почв была в 3.5-7 раз больше количества архей.

Археи обладают большей устойчивостью к субстратному дефициту, чем бактерии, что ведет к увеличению доли архей в метаболически активном прокариотном комплексе почвы с глубиной. По сравнению с бактериями, археи выступают более «олиготрофной» экологической группой. Соотношение бактерии/археи может служить индикатором эколого-трофического состояния микробного сообщества почв.

В серой лесной и аллювиально-луговой почве катены в составе домена Archaea детектируются филумы *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*. Использование зонда Cren537 либо детектирует не *Crenarchaeota*, а *Thaumarchaeota*, либо «истинные» кренархеоты-экстремофилы

метаболически неактивны в почве. Данные по числу метаболически активных клеток бактерий и архей в почве, полученные методом FISH, согласуются с количеством гена 16S рРНК, детектируемого с помощью количественной ПЦР, дающим представление обо всех формах архей и бактерий, включая живые, неактивные и мертвые. В зависимости от типа почвы, землепользования, глубины профиля на долю биомассы метаболически активных прокариот приходится от 1 до 6.8% углерода общей микробной биомассы.

3.4. ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ

Почва является наиболее сложной и комплексной средой на Земле с точки зрения микробного разнообразия. Бактериальные сообщества выполняют множество биологических функций в почвах, в том числе в поддержании биогеохимических циклов элементов и здорового состояния почвы [Zehnder et al., 2001; Weller et al., 2002; Basak and Biswas, 2010]. Свойства почвы, в свою очередь, выступают важными экологическими факторами, контролирующими состав, структуру и активность почвенных бактериальных сообществ через различные эндогенные физиолого-биохимические процессы [Upchurch et al., 2008; Gattinger et al., 2002; Smalla et al., 2001]. Оценка микробного биоразнообразия почв стала темой особого интереса в связи с развитием новых направлений экологии и биогеографии, но вместе с тем остается одной из самых сложных задач в области микробиологии. Считается, что до 80-99% почвенных микроорганизмов не может быть идентифицировано и охарактеризовано классическими методами культивирования [Amann et al., 1995]. Использование молекулярно-биологического метода высоко-производительного секвенирования гена 16S рРНК позволяет определить полную таксономическую структуру почвенного микробиома и учесть множество некультивируемых и редких представителей прокариот [Will et al., 2010; Eilers et al., 2011].

В предыдущих главах были получены отчетливые зависимости биомассы и численности бактерий и архей от почвенно-экологических условий. Однако остается открытым вопрос, какие классы, роды и виды представляют эти бактерии и археи? Какие таксоны доминируют в микробиомах исследуемых почв? Численность каких таксономических групп в первую очередь изменяется по катене, с глубиной или при агрогенной нагрузке?

3.4.1. ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОБИОМА ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО

С помощью технологии пиросеквенирования (Roche) была исследована таксономическая структура чернозема типичного под лесополосой, залежью и пашней (рис. 33-35).

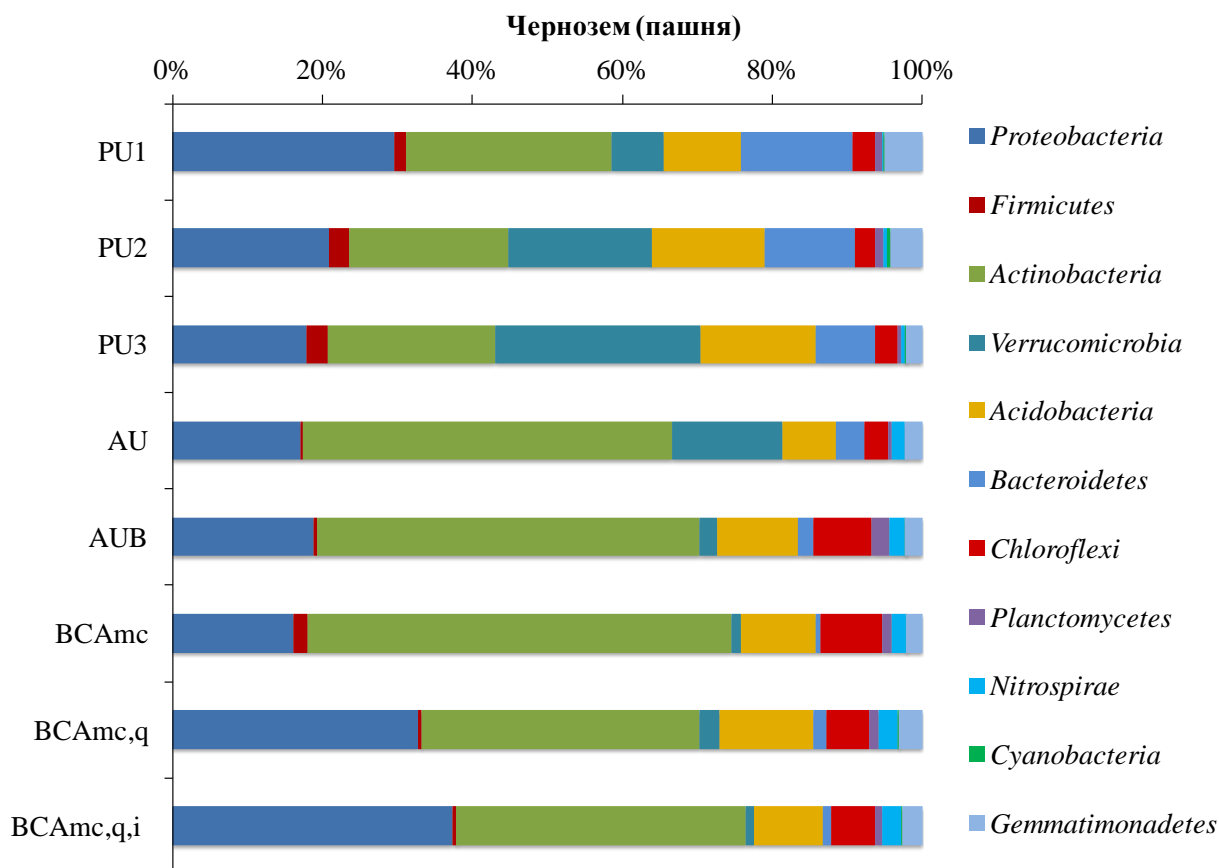


Рис. 33. Таксономическая структура бактериального сообщества разных горизонтов чернозема типичного под лесополосой.

Бактериальное сообщество чернозема исследуемых экосистем состояло преимущественно из представителей 10 филумов: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*. Наряду с привычным присутствием филумов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, представители недавно открытого филума *Verrucomicrobia* также входили в состав доминирующих таксонов, составляя до 50% в верхнем горизонте чернозема под лесополосой (рис. 33).

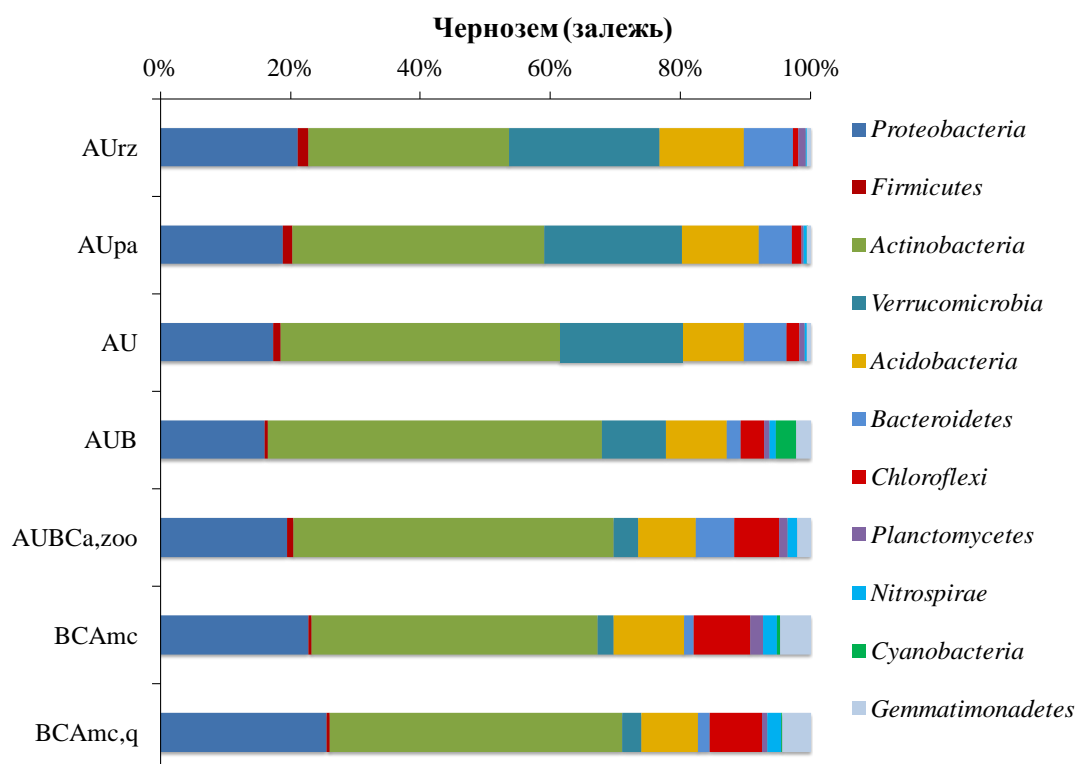


Рис. 34. Таксономическая структура бактериального сообщества разных горизонтов чернозема типичного под залежью.

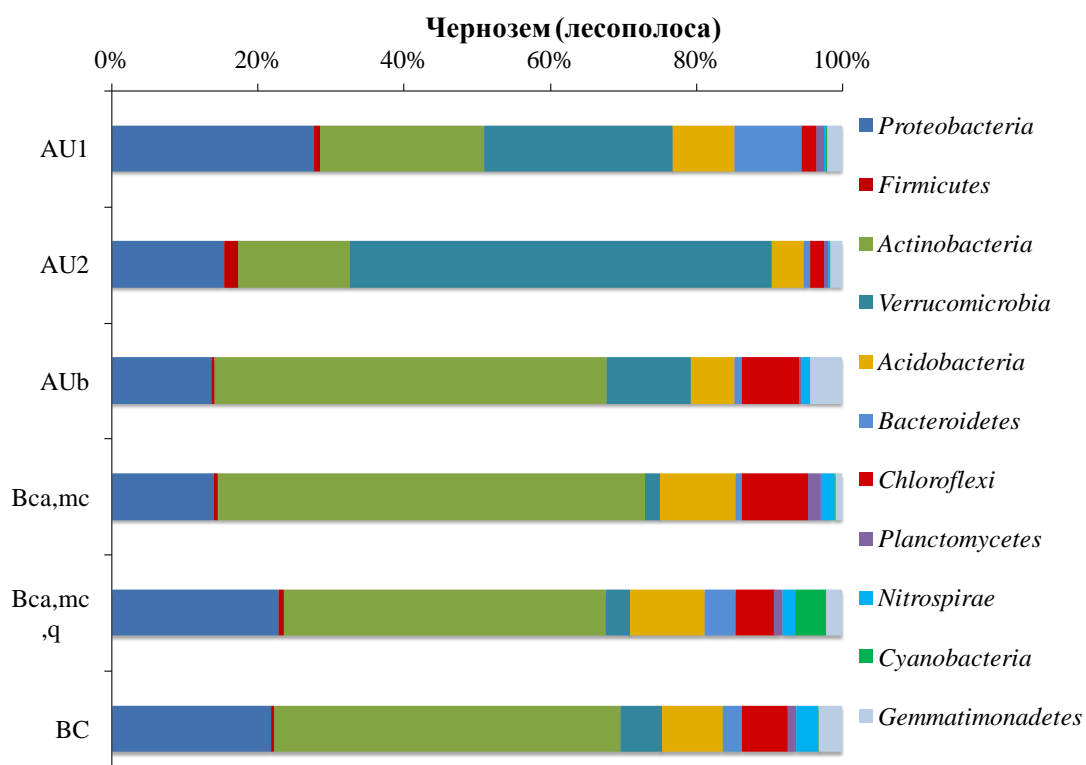


Рис. 35. Таксономическая структура бактериального сообщества разных горизонтов чернозема типичного под пашней.

Среди веррукомикробий наиболее представительным оказался вид *Chtoniobacter flavus*. Доля представителей *Verrucomicrobia* сильно

уменьшалась с глубиной, а также по мере увеличения агрогенной нагрузки. Наибольшей долей веррукомикробий отличалась почва под лесополосой, существенно меньшей – почва под залежью (рис. 34) и наименьшей – под пашней (рис. 35). В предыдущей главе отмечался факт значительного снижения метаболически активных клеток бактерий в пахотном черноземе по сравнению с лесополосой, в связи с чем можно сделать вывод, что этими бактериями были, прежде всего, веррукомикробии.

Помимо бактерий, высокую представленность в прокариотных сообществах исследуемых почв имели также археи – представители филума *Thaumarchaeota*. Их численность в гумусовых горизонтах достигала до 28% от общего количества определяемых прокариот, а в нижележащих минеральных горизонтах существенно снижалась. По современным представлениям, *Thaumarchaeota* являются отдельной филлой домена Archaea [Brochier-Armanet et al., 2008] и могут быть наиболее распространенными археями в почве. Как уже отмечалось, таумархеоты играют ведущую роль в биологическом окислении аммония – первой и ключевой стадии процесса нитрификации [Pester et al., 2011; Stieglmeier, 2014]. Степень представленности таумархеот в почве коррелирует с содержанием органического углерода и азота [Bates et al., 2011]. Приуроченность *Thaumarchaeota* к гумусированным горизонтам соответствует этой зависимости и может быть свидетельством их участия в трансформации почвенного органического вещества.

Обращает на себя внимание очень низкий процент представленности филума *Firmicutes* в составе бактерий и отсутствие *Euryarchaeota* в составе архей в типичном черноземе. Ранее, широкое распространение фирмикутов было отмечено в верхних горизонтах черноземных почв [Манучарова, 2008]. Известны, также, факты активности метаногенеза внутри агрегатов черноземов [Степанов, Манучарова, 2006], за который ответственны эвриархеоты. Причина недоучета данных групп, по-видимому, связана с методическими особенностями использованной процедуры

пиросеквенирования. Безусловно, представители *Firmicutes* являются одним из доминирующих бактериальных таксонов.

3.4.2. ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОБИОМОВ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ И АЛЛЮВИАЛЬНО-ЛУГОВОЙ ПОЧВ КАТЕНА

Для исследования таксономической структуры микробиомов серой лесной и аллювиально-луговой почв катены была использована технология секвенирования на Illumina MiSeq с двух сторон фрагментов. Бактериальное сообщество почв автономного, транзитного и аккумулятивного участков склонового ландшафта состояло преимущественно из представителей 13 филумов: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Caldithrix*, *Chlamydie* и *Synergistetes*.

Структура бактериальных сообществ на уровне филумов и классов. В почве автономного участка ландшафта доминировали представители четырех филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia*, суммарно на долю которых приходилось с учетом недетектируемых бактерий более 80% почвенного микробиома (рис. 36).

В верхнем горизонте А серой лесной почвы автономного участка доля протеобактерий составляла до 32%, уменьшаясь с глубиной. Доля филумов *Firmicutes* и *Actinobacteria* оставалась стабильной на разных глубинах (20-22%). Представители филума *Verrucomicrobia* занимали четвертое место по представленности (6-8%).

На уровне классов в почве автономного участка склона больше всего детектировалось *Actinobacteria* (15-19 %), α -*Proteobacteria* (7-13%), *Clostridia* (10-11%) и *Bacilli* (8-11%). Также к наиболее представленным классам можно было отнести β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria* и *Spartobacteria* (рис. 37).

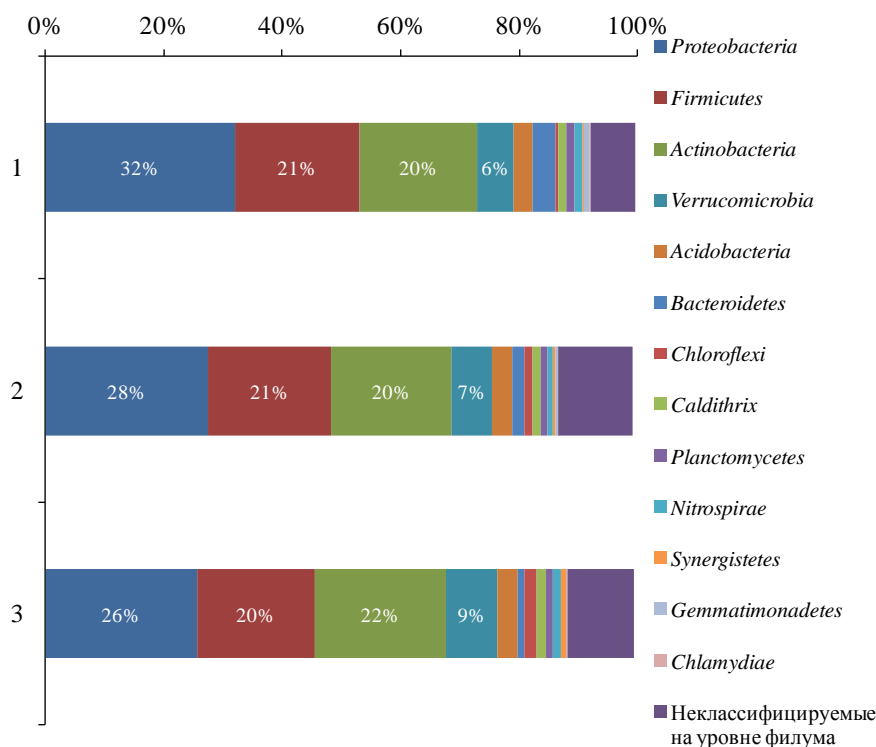


Рис. 36. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне филумов разных горизонтов серой лесной почвы автономного участка катены (1 - горизонт А; 2 - горизонт АВ; 3 - горизонт В).

В серой лесной почве транзитного участка ландшафта протеобактерии также занимали доминирующее положение в бактериальном сообществе комплексе, составляя 29-34% (рис. 38).

По сравнению с автономным участком катены, в серой лесной почве транзитного участка значительно возросла доля филума *Verrucomicrobia* (23 - 31%), который даже превзошел численность протеобактерий в верхнем горизонте почвы (рис. 38). Обращает на себя внимание резкое уменьшение численности представителей филумов *Firmicutes* и *Actinobacteria*, доля которых составила всего 7-13%. Среди доминант оказались также представители *Acidobacteria* и *Bacteroidetes*, в верхней части профиля превосходившие по представленности типичных представителей почв *Firmicutes* и *Actinobacteria*.

На уровне классов в почве транзитного участка склона обнаружено полное доминирование *Spartobacteria*, которые относятся к филуму *Verrucomirobia* (рис. 39).

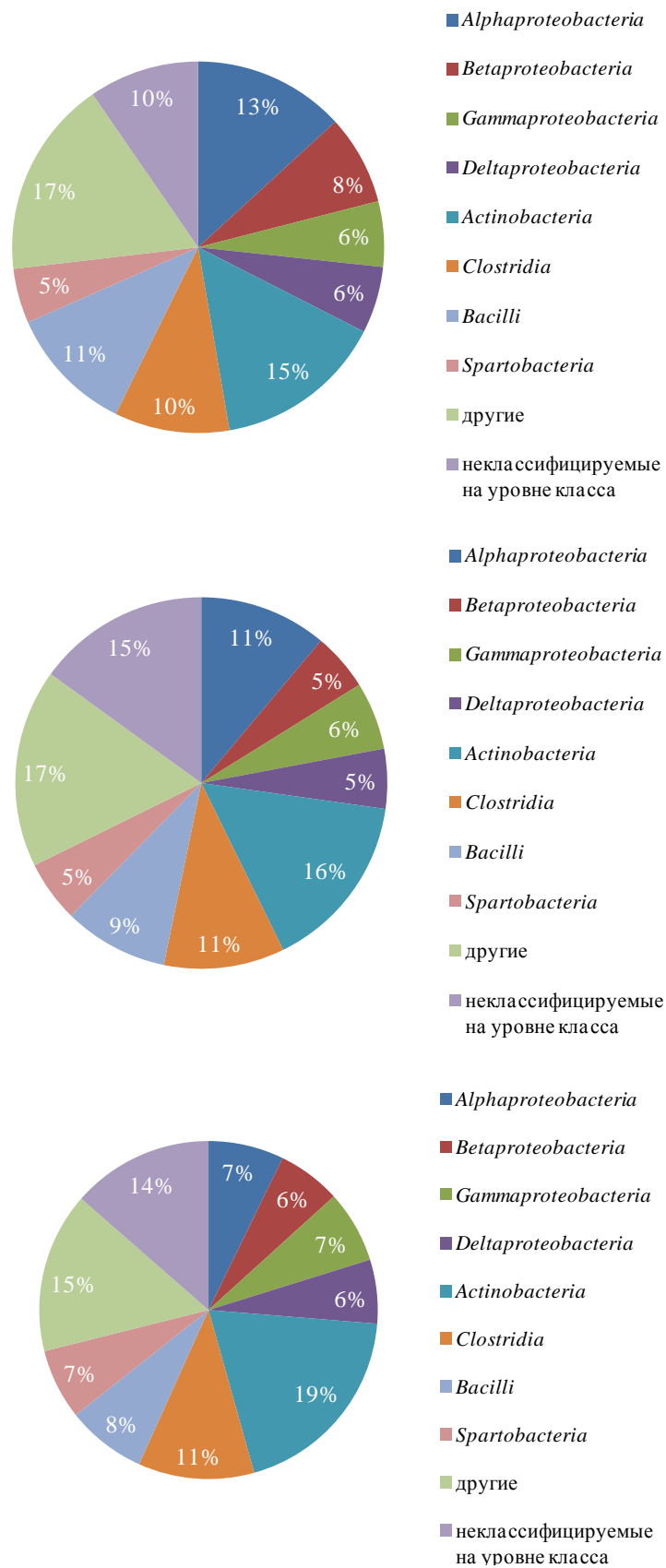


Рис. 37. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне классов разных горизонтов серой лесной почвы автономного участка катены (сверху вниз горизонты А, АВ и В).

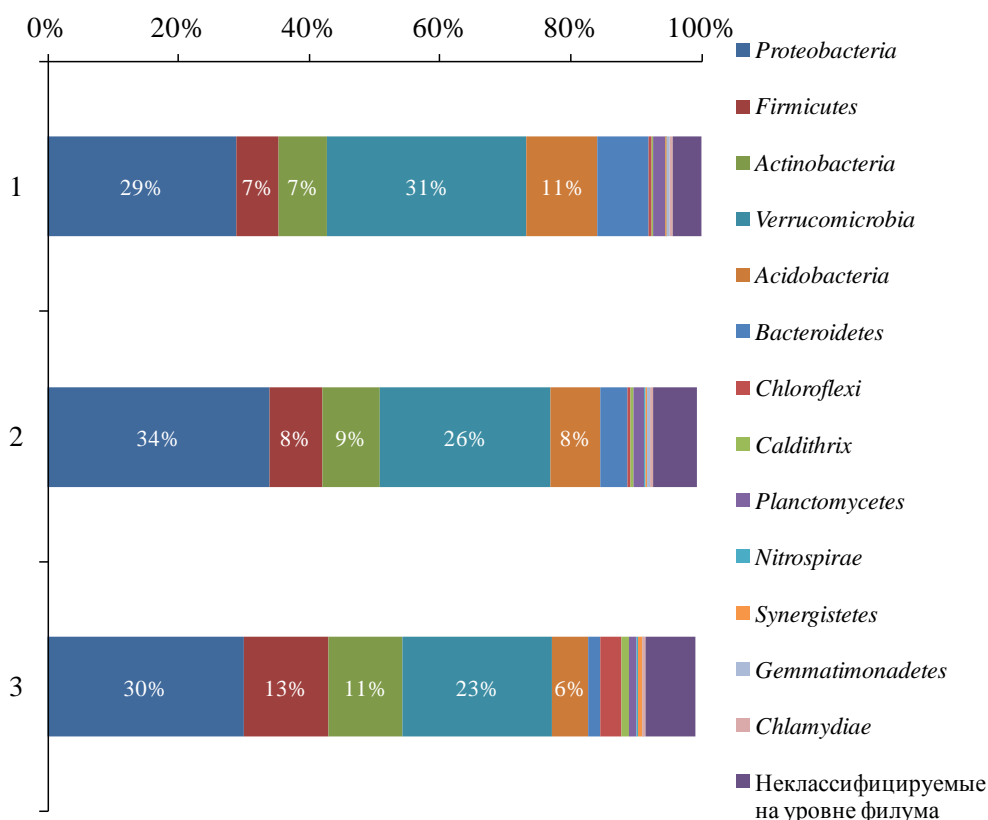


Рис. 38. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне филумов разных горизонтов серой лесной почвы транзитного участка катены (1 - горизонт А; 2 - горизонт АВ; 3 - горизонт В).

Доля спартобактерий доходила до 28% в верхней части профиля, но постепенно снижалась с глубиной, составляя в горизонте В уже 20% от класса. Также к доминирующим классам можно отнести *α-Proteobacteria*, представленность которых по сравнению с автономным участком также значительно возросла и на долю которых приходилось 10-18% бактерий. Остальные классы оказались мало представленными. В отличие от почвы автономного участка, в транзитном участке склона доля классов *Actinobacteria*, *Clostridia* и *Bacilli* уменьшилась примерно в два раза.

В аллювиально-луговой почве под лугово-болотной растительностью аккумулятивного участка выявлено полное доминирование филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, доля которых составила более 70% от всего бактериального сообщества (рис. 40).

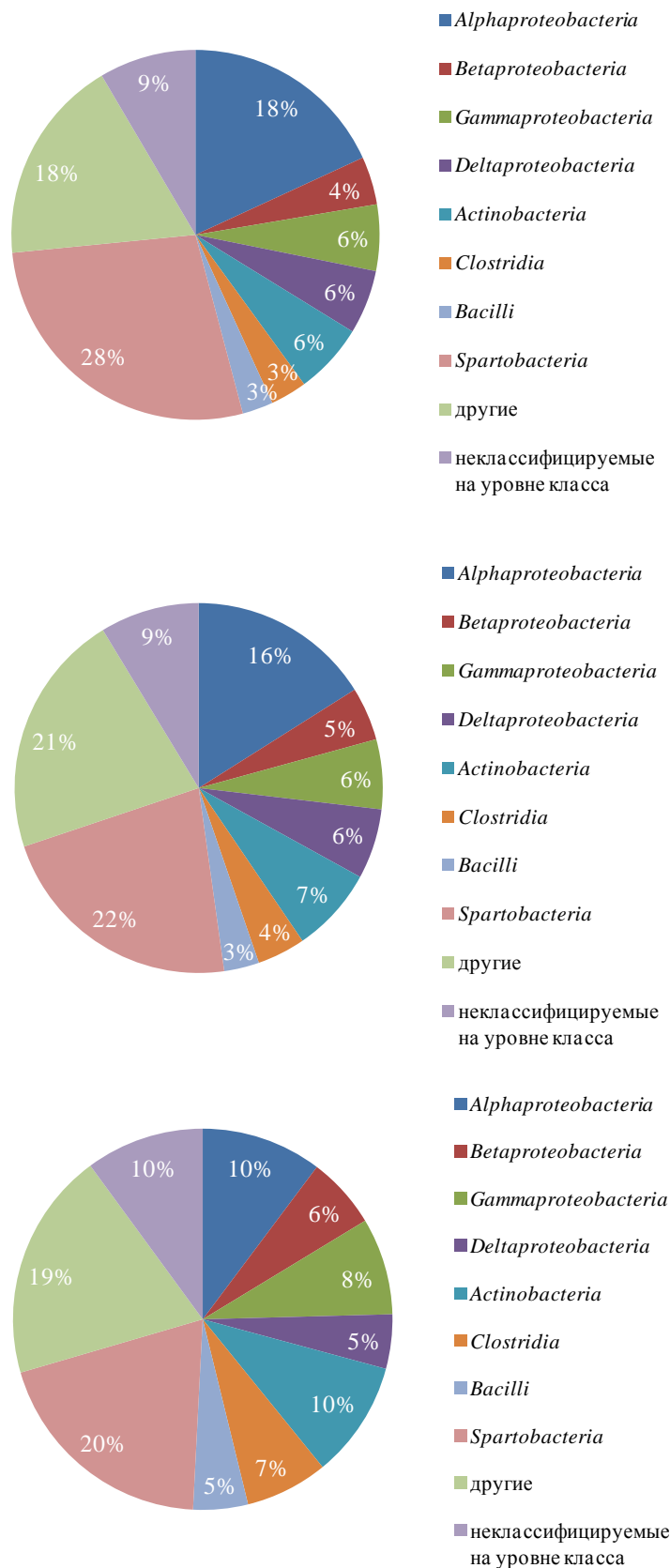


Рис. 39. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне классов разных горизонтов серой лесной почвы транзитного участка катены (сверху вниз горизонты А, АВ и В).

В верхнем горизонте аллювиально-луговой почвы более 5% приходилось также на представителей филума *Bacteroidetes*. На остальные «основные» филумы приходилось лишь 1-2%. В отличие от серой лесной почвы автономного и транзитного участков катены, в аллювиально-луговой почве среди основных таксонов не оказалось филума *Verrucomicrobia*, доля которого составила всего лишь 1.7-2.7% от микробиома.

Наиболее представленными классами в почве аккумулятивного участка катены были *Bacilli* (до 21%), *Clostridia* и *Actinobacteria*. Численность *Spartobacteria* составляла лишь десятые доли процента (рис. 41)

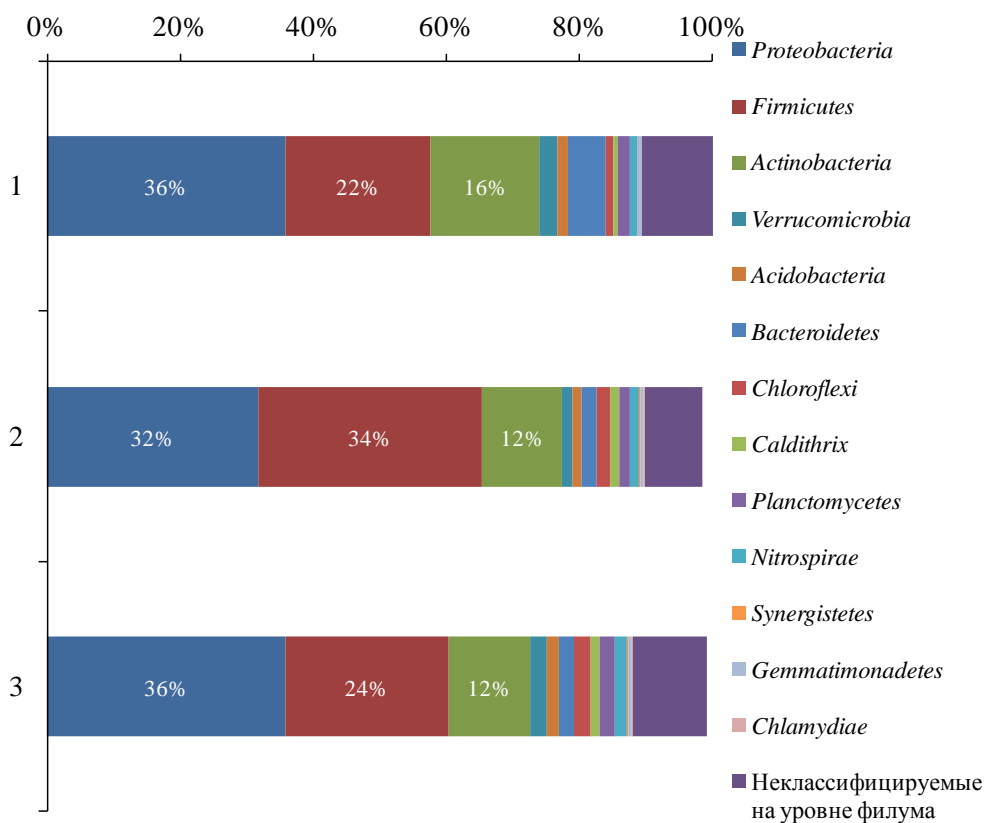


Рис. 40. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне филумов разных горизонтов аллювиально-луговой почвы аккумулятивного участка катены (1 - горизонт А; 2 - горизонт АВ; 3 - горизонт В).

Таксономическое разнообразие микроорганизмов на уровне родов и видов. В серой лесной почве автономного участка ландшафта под залежью самым представленным родом оказался представитель филума *Verrucomicrobia*, класса *Spartobacteria* - род *Chthoniobacter* (рис. 42) на долю

которого приходилось 5.3% от общего количества нуклеотидных последовательностей (или 7.6% от числа классифицированных последовательностей).

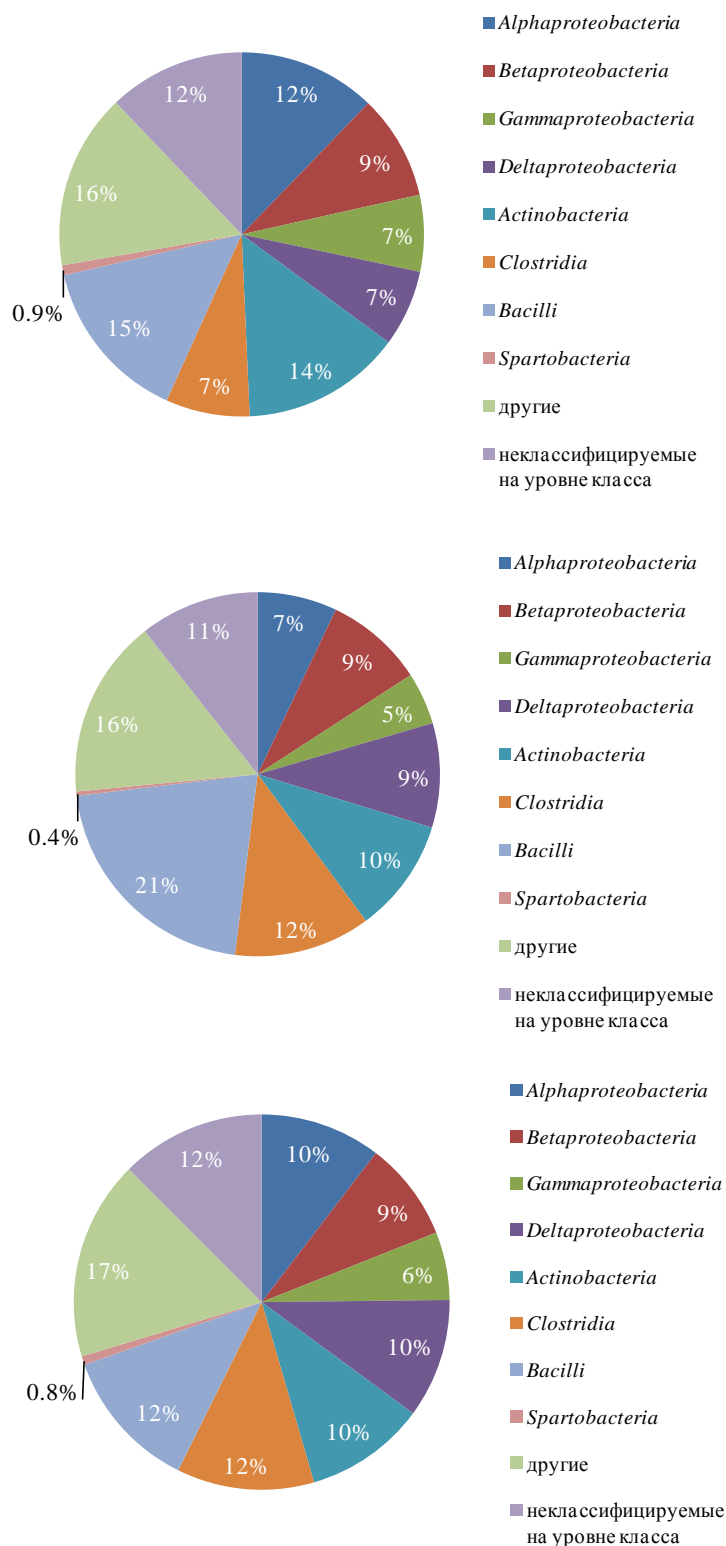


Рис. 41. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне классов разных горизонтов аллювиально-луговой почвы аккумулятивного участка катены (сверху вниз горизонты А, АВ и В).

Среди наиболее представленных родов были также представители филума *Firmicutes* – *Cohnella* (3.8%), *Bacillus* (3.2%), *Clostridium* (2.4%) и представитель филума *Actinobacteria* род *Conexibacter* (2.1%).

Таким образом, на долю 5 самых представленных родов приходилось 16.8% от общего количества последовательностей (или 24.1% от числа классифицированных последовательностей) (рис. 42). В серой лесной почве автономного участка также доминировали *Rhodoplanes*, *Caldithrix*, *Saccharopolyspora*, *Desulfovibrio*, *Petolomaculum*, *Koribacter*, *Solibacter*, *Actinoallomurus*, *Azospirillum* и *Kribbella*.

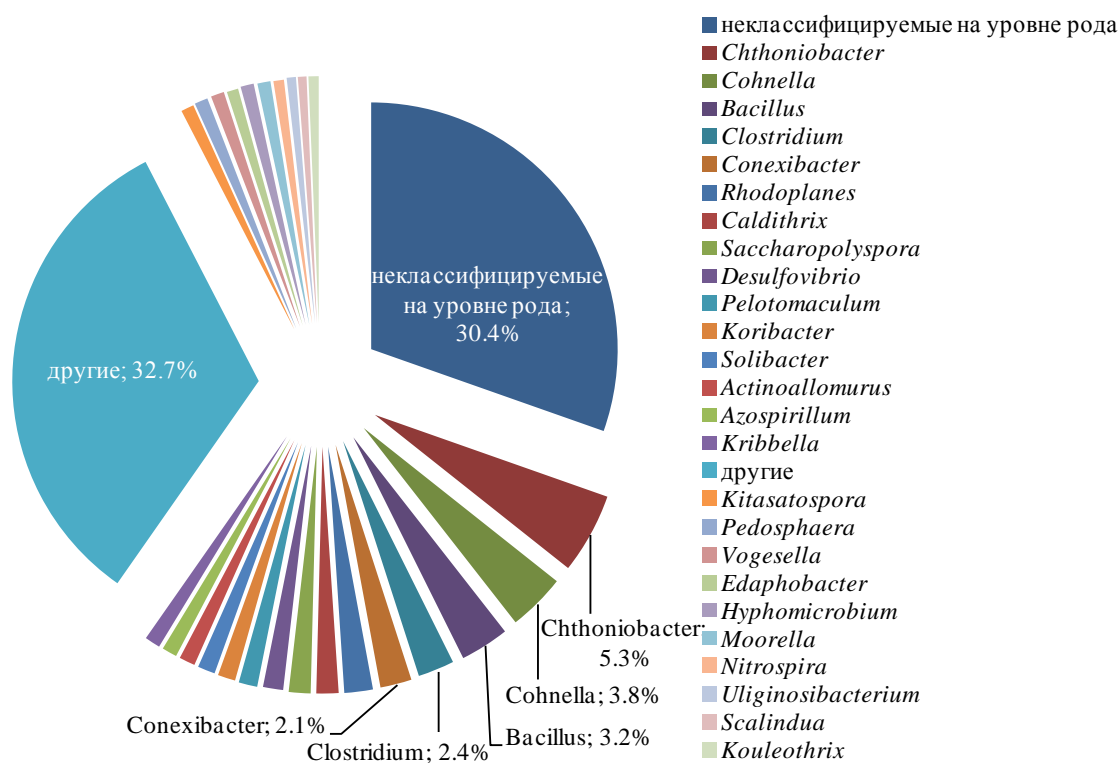


Рис. 42. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне родов в серой лесной почве автономного участка катены. В легенде обозначены наиболее представленные роды бактерий.

В почве транзитного участка ландшафта под узколиственным древостоем леса также доминировал род *Chthoniobacter*, причем по представленности он опережал остальные роды почти на порядок (20.8% от общего количества

нуклеотидных последовательностей и 25.5% от суммы классифицированных последовательностей) (рис. 43).

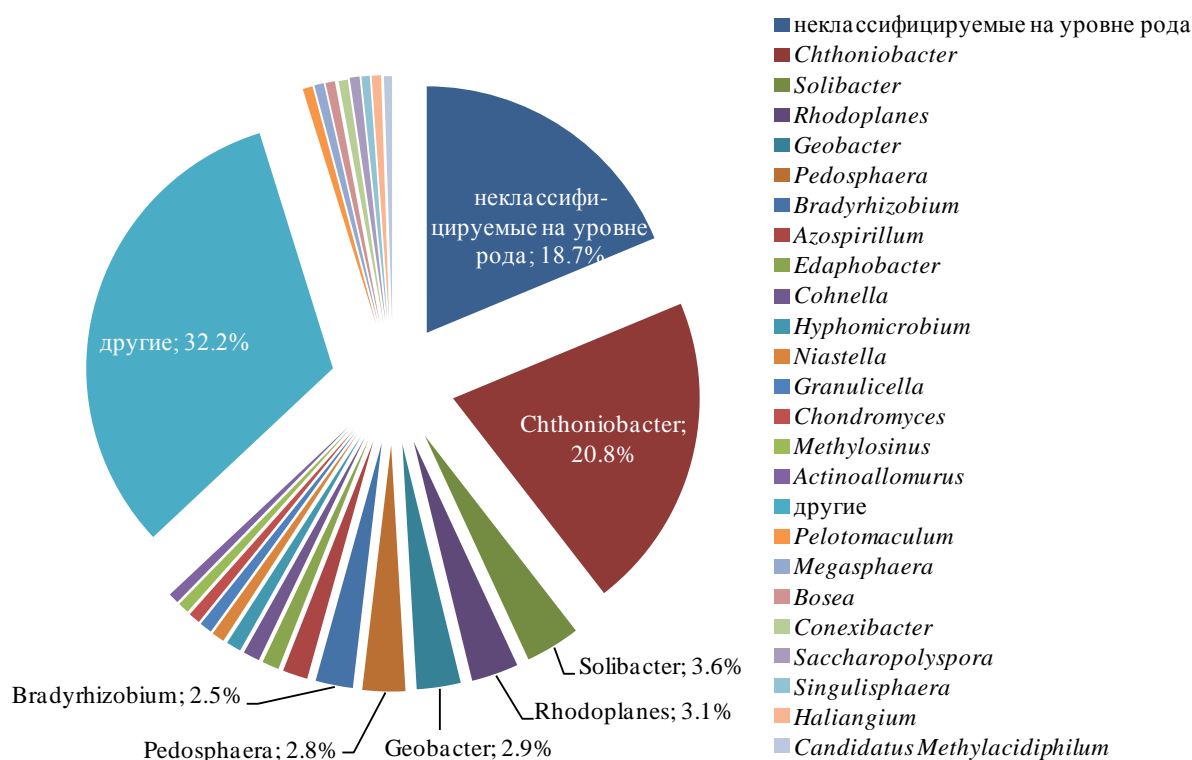


Рис. 43. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне родов серой лесной почвы транзитного участка катены. В легенде обозначены наиболее представленные роды бактерий в составе микробиома.

Многочисленными оказались роды *Solibacter* (*Acidobacteria*) - 3.6%, *Rhodoplanes* (α -*Proteobacteria*) - 3.1%, *Geobacter* (δ -*Proteobacteria*) - 2.9%, и *Bradyrhizobium* (α -*Proteobacteria*) - 2.5%. На долю 5 самых представленных родов приходилось более 33% от общего количества нуклеотидных последовательностей. Также в почве транзитного местоположения доминировали роды *Pedosphaera*, *Azospirillum*, *Edaphobacter*, *Cohnella*, *Hyphomicrobium*, *Niastella*, *Granulicella*, *Chondromyces*, *Methylosinus* и *Actinoallomurus*. Таким образом, по сравнению с автономным участком под залежью, в почве транзитного участка под лесом существенно поменялась таксономическая структура сообщества: тотальное доминирование имел род *Chthoniobacter*, а среди доминант были роды *Geobacter* и *Bradyrhizobium*, метанотрофы рода *Methylosinus*. В отличие от почвы более верхнего участка

катены, среди доминирующих родов отсутствовали *Actinobacteria* и *Firmicutes*.

В почве аккумулятивного участка под лугово-болотной растительностью доминировали представители филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*: роды *Bacillus* (14.6%), *Clostridium* (3.4%), *Desulfovibrio* (1.8%), *Saccharopolyspora* (1.6%) и *Gallionella* (1.6%) (рис. 44). Набор доминирующих родов почвы аккумулятивного участка катены, в целом, был довольно близок почве транзитного участка. Среди наиболее представленных родов данного микробиома фигурируют также *Geobacter*, *Caldithrix*, *Kribbella*, *Kitasaspora*, *Scalindua*, *Hyphomicrobium*, *Pelotomaculum*, *Sporotomaculum*, *Nitrospira* и *Paenibacillus*. Принципиальным отличием аллювиально-луговой почвы от почвы других участков оказалось отсутствие рода *Chthoniobacter* среди доминант микробного сообщества.

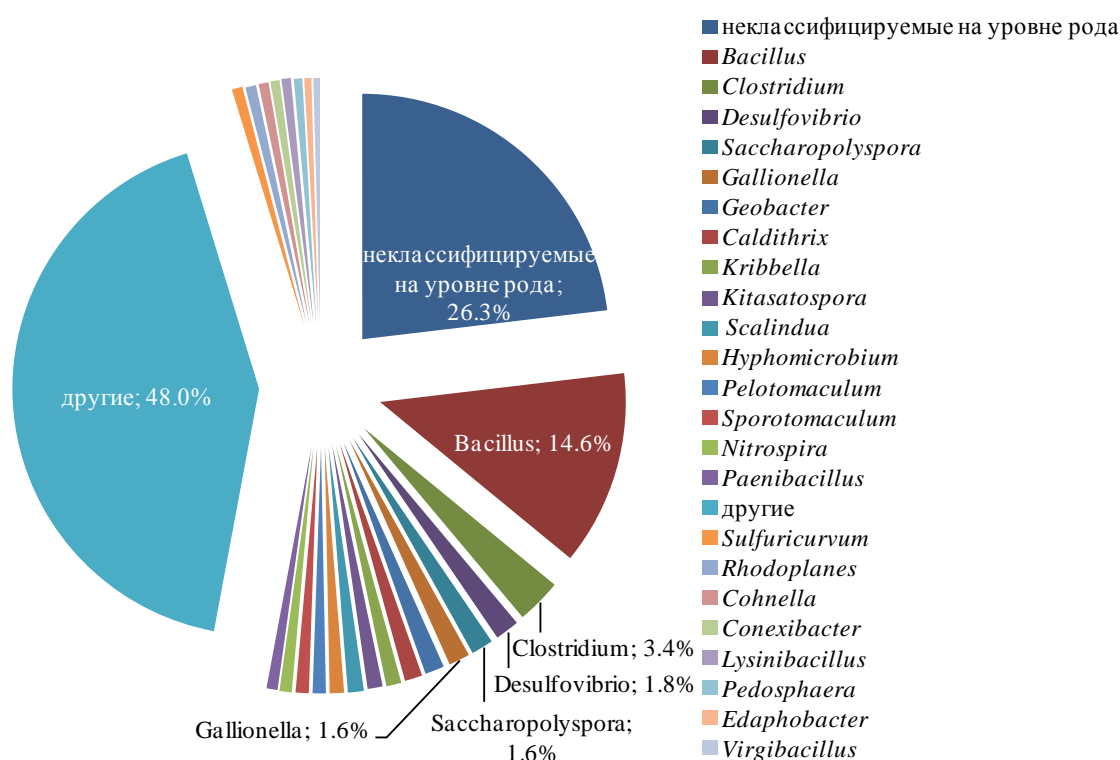


Рис. 44. Таксономическая структура бактериального сообщества на уровне родов аллювиально-луговой почвы аккумулятивного участка катены. В легенде обозначены наиболее представленные роды бактерий в составе микробиома.

Видовая структура микробных доминантов. Наиболее представленным видом в микробиоме серой лесной почвы автономного и транзитного участков оказался *Chthoniobacter flavus*, в аллювиально-луговой почве аккумулятивной части катены – *Bacillus longiquaesitum* и *Bacillus nealsonii* (табл. 10). Как уже отмечалось выше, микробиомы серой лесной почвы автономного и транзитного участка были довольно схожи. Среди доминант в микробном сообществе почвы этих участков катены, помимо *Chthoniobacter flavus*, выделяются также *Cohnella soli*, *Pelotomaculum isophthalicicum*, *Edaphobacter modestus*, *Caldithrix palaeochoryensis*, *Uliginosibacterium gangwonense*, *Hyphomicrobium vulgare*. Аллювиально-луговая почва также была представлена некоторыми из перечисленных выше видов. В отличие от серой лесной почвы в аллювиально-луговой почве аккумулятивного участка катены вид *Chthoniobacter flavus* не был среди доминант микробного сообщества. Кроме того, в доминантах почвенного микробиома аллювиально-луговой почвы оказались 4 вида рода *Bacillus*.

Бактерия *Chthoniobacter flavus* представляет собой аэробный гетеротрофный вид, который способен расти на многих углеводных компонентах растительной биомассы, но не проявляет признаков роста на аминокислотных или органических кислотах кроме пирувата [Sangwan et al., 2004]. *Chthoniobacter flavus* также не имеет генов для осуществления фиксации N₂ и не способен расти в анаэробных условиях. Судя по всему, данная бактерия участвует в процессах трансформации органического вещества в почвах [Sangwan et al., 2004]. До сих пор остается не совсем ясным, почему столь распространенные и многочисленные в почвах представители класса *Spartobacteria* до недавнего времени не обнаруживались на питательных средах. Еще одним идентифицируемым представителем класса *Spartobacteria* оказался вид *Candidatus Xiphinematobacter*, являющийся облигатным внутриклеточным эндосимбионтом нематод [Vanderkerckhove et al., 2002]. Показано, что *Candidatus Xiphinematobacter* заселяют эпителий кишечника ювенильных особей нематод рода *Xiphinema spp.*

Таблица 10. Доминирующие виды микробного сообщества почв трех участков катены.

Автономный участок	Транзитный участок	Аккумулятивный участок
<i>Chthoniobacter flavus</i>	<i>Chthoniobacter flavus</i>	<i>Bacillus longiquaesitum</i>
<i>Cohnella soli</i>	<i>Cohnella soli</i>	<i>Bacillus nealsonii</i>
<i>Caldithrix palaeochoryensis</i>	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i>	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>
<i>Pelotomaculum isophthalicum</i>	<i>Edaphobacter modestus</i>	<i>Bacillus siralis</i>
<i>Bacillus longiquaesitum</i>	<i>Actinokineospora inagensis</i>	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i>
<i>Kribbella ginsengisoli</i>	<i>Chitinophaga soli</i>	<i>Sporotomaculum syntrophicum</i>
<i>Vogesella perlucida</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	<i>Caldithrix palaeochoryensis</i>
<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	<i>Gallionella ferruginea</i>
<i>Uliginosibacterium gangwonense</i>	<i>Candidatus Xiphinematobacter</i>	<i>Kribbella ginsengisoli</i>
<i>Edaphobacter modestus</i>	<i>Caldithrix palaeochoryensis</i>	<i>Hyphomicrobium vulgare</i>
<i>Desulfovibrio oryzae</i>	<i>Uliginosibacterium gangwonense</i>	<i>Kribbella ginsengisoli</i>
<i>Chondromyces pediculatus</i>	<i>Actinoallomurus yoronensis</i>	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>
<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	<i>Sporotomaculum syntrophicum</i>	<i>Desulfovibrio oryzae</i>
<i>Kouleothrix aurantiaca</i>	<i>Ectothiorhodospira haloalkaliphila</i>	<i>Bacillus asahii</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Staphylococcus ciuri</i>	<i>Azohydromonas australica</i>

В нашем исследовании *Candidatus Xiphinematobacter* был широко представлен в почвах автономного и транзитного участков. В серой лесной почве транзитного участка *Candidatus Xiphinematobacter* вошел в число наиболее представленных видов почвенного микробиома (табл. 10). Характерной особенностью распространения данного вида являлось значительное снижение численности с глубиной.

Наиболее отличающимся микробным сообществом характеризовалась аллювиально-луговая почва аккумулятивного участка катены. Для этой почвы было характерно переувлажнение, которое отражалось в доминировании облигатных или факультативных микроорганизмов-анаэробов. Помимо высокого разнообразия архей-метаногенов, микробное сообщество было представлено очень широким спектром бактерий, участвующих в циклах железа (*Gallionella ferruginea*, *Rhodoferax ferrireducens*, *Rhodoferax sp.*, *Carboxydocella ferrireducens*, *Gallionella capsiferriformans* и др.) и серы (*Desulfomonile iedjei*, *Sulfurospirillum sp.*, *Desulfonatronum thiosulfatophilum*, *Thermodesulfovibrio thiophilus*, *Thermodesulfovibrio aggregans*, *Ammonifex thiophilus* и др.).

3.4.3. МЕТАНОГЕННО-МЕТАНОТРОФНОЕ СООБЩЕСТВО СЕРОЙ ЛЕСНОЙ И АЛЛЮВИАЛЬНО-ЛУГОВОЙ ПОЧВ КАТЕНЫ И ОБМЕН МЕТАНА В СИСТЕМЕ ПОЧВА-АТМОСФЕРА

В обмене метана может преобладать как эмиссия, так и потребление из атмосферы, что обусловлено разным откликом одновременно функционирующих метаногенных и метанотрофных микроорганизмов на условия почвы и факторы окружающей среды. В анаэробных микроразонах почвы преобладает продукция CH_4 , в аэробных – потребление, причем активность метанотрофных бактерий инициируется метаном, продуцируемым почвенными метаногенами [Le Mer, Roger, 2001; Kammann et al., 2009]. Поэтому определение скорости обмена метана является

чувствительным методом индикации доступности субстратов почвенным микроорганизмам и их физиологической активности.

Исследование потоков газов *in situ* показало, что для серой лесной почвы автономной, транзитной и транзитно-аккумулятивной частей ландшафта характерным было поглощение атмосферного метана (табл. 11) Аллювиально-луговая почва аккумулятивной части ландшафта проявляла свойства как стока, так и источника метана. Чем ниже местоположение почвы в катене, тем больше размеры эмиссии закиси азота.

Таблица 11. Скорости потока метана в разных местоположениях склонового ландшафта, C-CH₄, мкг/м² в час.

Дата отбора	Место отбора				
	1	2	3	4	5
24.VI	-12±0	-40±10	-30±4	-27±4	-10±1
25.VI	-16±2	-38±4	-28±5	-29±5	-8±3
22.IX	-15±9	-50±6	-37±21	-4±3	101±18

Примечание: 1 – автономная часть ландшафта, 2 – транзитная, 3 – транзитная, 4 – транзитно-аккумулятивная, 5 – аккумулятивная. Отрицательные значения потока метана указывают на его поглощение из атмосферы.

Определение скорости потока газов с поверхности почвы показывает результирующую разных процессов, которые в той или иной степени вовлечены в их обмен с атмосферой. При этом эмиссии и реутилизации подвергаются газы, образующиеся как в верхнем слое почвы, так и диффундирующие из нижележащих слоев. Поэтому реальный обмен газов внутри почвы может отличаться от регистрируемого по скорости потока на границе раздела почвы и атмосферы. Об участии разных слоев и горизонтов почвы в обмене газов обычно судят по концентрации последних в почвенном воздухе на разной глубине. В наших исследованиях это было сделано путем сравнения скоростей потоков с дневной поверхности почвы и с поверхности слоев, защищенных на глубине 10 и 20 см.

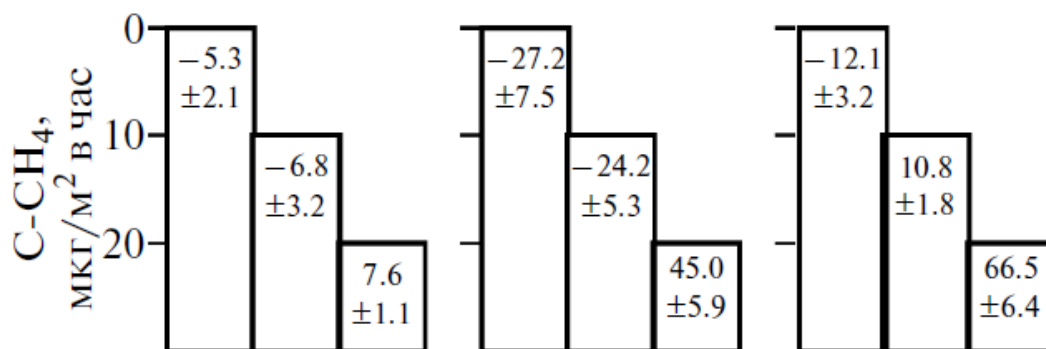


Рис. 45. Активность разных слоев почвы в обмене метана. Обозначения: А – автономная часть ландшафта, точка 1. Б – транзитная, точка 3. В – аккумулятивная, точка 5.

Из представленных на рис. 45 данных видно, что наибольшая метанотрофная активность свойственна поверхностному слою почвы. Высокая скорость поглощения метана в почве транзитной части ландшафта под лесом развивалась на фоне значительного его выделения с глубины ниже 0-20 см. Это согласуется с гипотезой об иницировании активности метанотрофных бактерий метаном, поступающим из нижележащих слоев почвы [Kammann et al., 2009]. В аллювиально-луговой почве аккумулятивной части ландшафта метанотрофная способность может ограничиваться периодическим переувлажнением нижних слоев верхнего горизонта, что ведет к уменьшению объема активной метанотрофной зоны. В отличие от других участков ландшафта, в аккумулятивной его части эмиссия метана преобладала уже глубже 10 см, а глубже 20 см она была максимальной.

Процессы образования и поглощения метана осуществляют довольно узкие группы микроорганизмов, которые можно легко вычлениить из всего разнообразия микроорганизмов, обитающих в почвах. Среди метанотрофов в микробном сообществе почв в автономном и транзитном участках катены детектировались лишь два вида, которые и были ответственны за метанопоглощительную способность почв: *Methylosinus pucelana* и *Methylosinus acidophilus* (представители класса α -Proteobacteria). В аккумулятивном участке катены состав метанотрофов был более

разнообразным: помимо отмеченных двух видов, которые доминировали в метанотрофном комплексе аллювиально-луговой почвы, были также идентифицированы отдельные последовательности видов *Methylomicrobium agile*, *Methylomonas scandinavica* и *Methylocystis sp* (табл. 12).

Таблица 12. Видовой состав метанотрофного сообщества почв трех участков катены

Автономный участок	Транзитный участок	Аккумулятивный участок
<i>Methylosinus pucelana</i>	<i>Methylosinus pucelana</i>	<i>Methylosinus pucelana</i>
<i>Methylosinus acidophilus</i>	<i>Methylosinus acidophilus</i>	<i>Methylosinus acidophilus</i>
		<i>Methylomicrobium agile</i>
		<i>Methylomonas scandinavica</i>
		<i>Methylocystis sp.</i>

Количество нуклеотидных последовательностей метанотрофов хорошо согласовывалось со значениями поглощения метана почвой. Тем не менее, данных по нескольким контрольным точкам недостаточно, чтобы однозначно определить, есть ли реальная зависимость между количеством нуклеотидных последовательностей метаногенов и скоростью поглощения метана почвой.

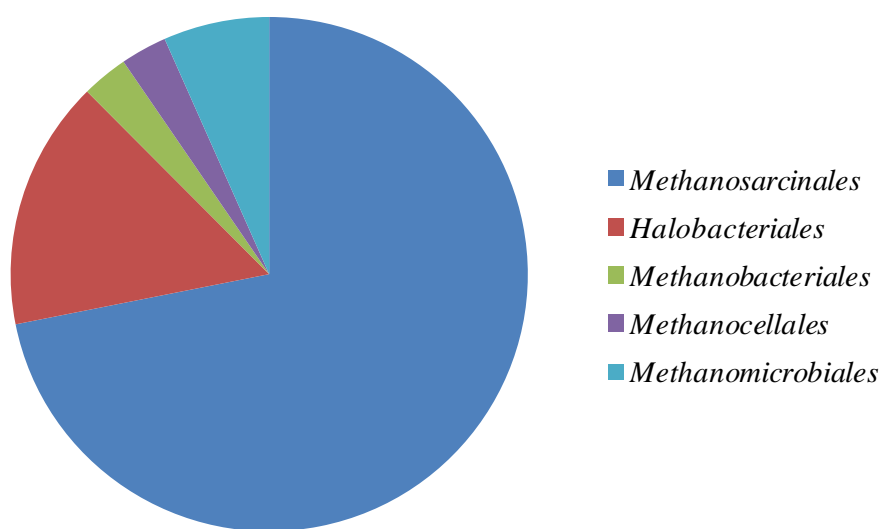


Рис. 46. Таксономическое разнообразие филума *Euryarchaeota* на уровне порядков в аллювиально-луговой почве аккумулятивной части ландшафта.

Таким образом, можно сделать вывод, что детектируемые методом FISH метаболически активные клетки эвриархеот, имеющие высокую численность в аллювиально-луговой почве, являются в большинстве своем именно метаногенами. Кроме того, среди метаногенов выявлено абсолютное доминирование порядка *Methanosarcinales*, на долю которых приходилось почти 75% эвриархеот (рис. 46).

В аллювиально-луговой почве было детектировано 16 родов метаногенов. Наиболее представленными оказались три рода – *Methanolobus*, *Methanosaeta* и *Methanococcoides*, которые вероятно и ответственны за продукцию метана почвой (рис. 47).

Таблица 13. Видовой состав метаногенного сообщества аллювиально-луговой почвы катены.

<i>Methanolobus taylori</i>
<i>Methanococcoides methylutens</i>
<i>Methanosaeta concilii</i>
<i>Methanosaeta pelagica</i>
<i>Methanosaeta thermophila</i>
<i>Methanofollis ethanolicus</i>
<i>Methanobacterium oryzae</i>
<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>
<i>Methanobrevibacter acididurans</i>
<i>Methanobrevibacter acididurans</i>
<i>Methanohalophilus mahii</i>
<i>Methanosarcina siciliae</i>
<i>Methanocorpusculum parvum</i>
<i>Methanocella conradii</i>
<i>Methanobacterium kanagiense</i>
<i>Methanocella paludicola</i>
<i>Methanoregula sp.</i>
<i>Methanosalsum sp.</i>
<i>Methanogenium sp.</i>
<i>Methanolinea sp.</i>
<i>Methanospirillum sp.</i>
<i>Methanoculleus sp.</i>

Среди метаногенных архей было детектировано 22 вида (табл. 13). На уровне видов подавляющее большинство последовательностей принадлежат

представителям *Methanolobus taylori*, *Methanococcoides methylutens* (*Methanotherix methylens*), *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta pelagica*. Данные метаногены имеют близкие экологические характеристики: для этих видов характерно обитание в морских или сильно переувлажненных местообитаниях, умеренная галофильность и существование при умеренных или слабощелочных значениях pH [Patel, Sprot, 1990; Mori et al., 2012; Sowers, Ferry, 1983].

3.4.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении таксономического состава почвенного микробного сообщества с использованием глубокого секвенирования тотальной почвенной ДНК оказалось, что доминирующими таксонами в составе микробиомов часто выступают виды и таксоны, которые плохо детектировались или вовсе не детектировались методами классической микробиологии. Так, недавно открытый филум *Verrucomicrobia* оказался одним из самым представительных в верхних горизонтах серой лесной почвы и чернозема типичного. Мало известный почвенным микробиологам вид *Chthoniobacter flavus* полностью доминировал в микробном сообществе серой лесной почвы транзитного участка под лесной растительностью, на долю которого приходилось более 20% от всех нуклеотидных последовательностей бактерий.

Комбинация молекулярно-биологических методов секвенирования гена 16S рРНК и флюоресценции *in situ* гибридизации позволяет не только определить количественные и качественные характеристики прокариотного сообщества почв, но и выявить функциональную составляющую микробиома – специфику состава метаногенного и метанотрофного сообществ почв катены в местах превалирования эмиссии и поглощения метана.

ВЫВОДЫ

1. Количественное выделение почвенной дцДНК является информативным, воспроизводимым и удобным способом измерения общей микробной биомассы в разных почвах.

2. Количество метаболически активных клеток бактерий в верхнем слое гумусового горизонта отчетливо уменьшается в следующем ряду почв: аллювиально-луговая > серая лесная > чернозем типичный > бурая полупустынная. Число активных клеток архей было в 3.5-7.5 раза меньше, чем бактерий, а последовательность уменьшения в ряду почв была иной: чернозем типичный (лесополоса) = аллювиально-луговая > серая лесная > чернозем типичный (пашня) > бурая полупустынная.

3. Содержание органического углерода в почве было ведущим фактором, контролирующим внутрипрофильное распределение метаболически активных клеток архей и бактерий. Уменьшение содержания органического углерода и общего азота сопровождалось сужением соотношения бактерии/археи вниз по профилю почв, свидетельствуя о лучшей приспособленности архей к недостатку углерода и азота.

4. Величины углерода метаболически активной биомассы бактерий и архей колебались в диапазоне 0.65-9.94 мкг г⁻¹ почвы и 0.17-1.81 мкг г⁻¹ почвы, соответственно. На долю активной биомассы прокариот приходится от 1 до 6.8% от общей микробной биомассы.

5. Использование специфичных олигонуклеотидных проб выявило, что метаболически активный комплекс сообществ архей представлен филумами *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota*. Нуклеотидные последовательности архей филума *Crenarchaeota* детектируются в почвах, но они, по-видимому, метаболически неактивны.

6. Представители филума *Verrucomicrobia* доминировали в микробиомах серой лесной почве и черноземе естественных экосистем, составляя 31 и 55% соответственно. Численность *Verrucomicrobia* была

наиболее чувствительна к агрогенной нагрузке. Среди видов в серой лесной почве и черноземе наиболее представленными были *Chtoniobacter flavus*, а в аллювиально-луговой почве *Bacillus nealsonii* и *Bacillus longiquaesitum*.

7. Представители метаногенов *Methanolobus taylori*, *Methanococcoides methylutens*, *Methanosaeta concilii* и *Methanosaeta pelagica* составляют более 60% от видовой разнообразия метаногенов, а метанотрофное сообщество представлено преимущественно двумя видами - *Methylosinus puelana* и *Methylosinus acidophilus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Ю.Е., Карпухина Е.А., Прилепский Н.Г. Растительный покров окрестностей Пущина. Пущино. 1992. 178 с.
2. Алифанов В.М. Палеокриогенез и современное почвообразование. Пущино: ОНТИ. 1995. 320 с.
3. Ананьева Н.Д., Сусьян Е.А., Чернова О.В. и др. Соотношение грибов и бактерий в биомассе разных типов почв, определяемое селективным ингибированием // Микробиология. 2006. Т. 75. № 6. С. 702–707.
4. Анненская Г.Н., Жучкова В.К., Калинина В.Р., Мамай И.И., Низовцев В.А., Хрусталева М.А., Цесельчук Ю.Н., Ландшафты Московской области и их современное состояние. Смоленск: Издательство СГУ. 1997. 296 с.
5. Благодатский С.А., Благодатская Е.В., Горбенко А.Ю., Паников Н.С. Регидратационный метод определения микробной биомассы в почве // Почвоведение. 1987. № 4. С. 64-71.
6. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС. 2001. 500 с.
7. Единый государственный реестр почвенных ресурсов России. Версия 1.0. М.: Почвенный ин-т им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии, 2014. 768 с.
8. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение природоведческую микробиологию: Учебное пособие. М.: Книжный дом «Университет», 2001. 256 с.
9. Зборищук Ю.Н., Рымарь В.Т., Чевердин Ю.И. Состояние черноземов обыкновенных Каменной степи. М.: МГУ, 2007. 160 с.
10. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. 256 с.
11. Камышев Н. С., Хмелев К. Ф. Растительный покров Воронежской области и его охрана. Воронеж: ВГУ, 1976. 168 с.
12. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Издательство: МГУ, 1989. 175 с.
13. Кравченко И.К., Семенов В.М., Кузнецова Т.В., Быкова С.А., Дулов Л.Е., Пардини Д., Гисперт М., Боукс П., Ван Климпут О., Гальченко В.Ф. Физико-химические и биологические факторы, контролирующие

- окисление атмосферного метана в серых лесных почвах // Микробиология. 2005. Т.74. № 2. С. 255-260.
14. Кузнецов А.М., Иванникова Л.А., Семин В.Ю., Надежкин С.М., Семенов В.М. Влияние длительного применения удобрений на биологическое качество органического вещества выщелоченного чернозема // Агрохимия. 2007. № 11. С. 21-31.
 15. Манучарова Н.А. Идентификация метаболически активных клеток прокариот в почвах с применением молекулярно-биологического флюоресцентно-микроскопического метода анализа fluorescence in situ hybridization (FISH). М.: Университет и школа, 2008. 23 с.
 16. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Звягинцев Д.Г., Менько Е.В., Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 219-229.
 17. Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Умаров М.М. Особенности микробной трансформации азота в водопрочных агрегатах почв разных типов // Почвоведение. 2001. № 10. С.1261-1267.
 18. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Учебное пособие. Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
 19. Милановский Е.Ю., Хайдапова Д.Д., Поздняков А.И., Тюгай З.Н., Початкова Т.Н., Черноморченко Н.И., Манучаров А.С // Практикум по физике твердой фазы почв: учебное пособие. М. 2011. 63 с.
 20. Мирчинк Т.Г., Паников Н.С. Современные подходы к оценке биомассы и продуктивности грибов и бактерий в почве // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 198-226.
 21. Панкова Е.И., Новикова А.Ф., Конюшкова М.В., Шадрина М.Б., Мухортов В.И. Почвы в зоне контакта светло-каштановых и бурых аридных почв на юге европейской России // Аридные экосистемы. 2014. Т. 20. № 3 (60). С. 79-93.
 22. Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Содержание и структура микробной биомассы как показатели экологического состояния почв // Почвоведение. 2005. № 6. С. 706-714.
 23. Полянская Л.М., Горбачева М.А., Милановский Е.Ю., Звягинцев Д.Г. Развитие микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях в черноземе // Почвоведение. 2010. № 3. С. 356-360.

24. Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г. Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // Почвоведение. 1995а. № 3. С. 322-328.
25. Полянская Л.М., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г. Микробная биомасса в почвах // Доклады Академии наук. 1995б. Т. 344. № 6. С. 846-848.
26. Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Звягинцев Д.Г. Биомасса грибов в различных типах почв // Почвоведение. 1995в. № 5. С. 566-572.
27. Семенов В.М., Иванникова Л.А., Кузнецова Т.В., Семенова Н.А., Тулина А.С. Минерализуемость органического вещества и углерод-секвестрирующая емкость почв зонального ряда // Почвоведение. 2008. № 7. С. 819-832.
28. Семенов В.М., Иванникова Л.А., Тулина А.С. Стабилизация органического вещества в почве // Агрехимия. 2009. № 10. С. 77-96.
29. 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.
30. Семенов М.В., Стольникова Е.В., Ананьева Н.Д., Иващенко К.В. Структура микробного сообщества почвы катены правобережья р. Оки // Известия РАН. Серия биологическая. 2013. № 3. С. 299-308.
31. Сергалиев Н.Х., Какишев М.Г., Жиенгалиев А.Т., Володин М.А., Андронов Е.Е., Пинаев А.Г. Применение нового метода очистки ДНК микробиоты каштановых почв Западно-Казахстанской области для метагеномного анализа // Почвоведение. 2015. № 4. С. 479-485.
32. Смагин А.В. Газовая функция почв // Почвоведение. 2000. №10. С.1211-1223.
33. Степанов А.Л., Манучарова Н.А. Образование и поглощение парниковых газов в почвенных агрегатах. М.: Издательство МГУ, 2006. 82 с.
34. Стольникова Е.В. Микробная биомасса, ее структура и продуцирование парниковых газов почвами разного землепользования: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: МГУ, 2010. 26 с.
35. Сусьян Е.А., Ананьева Н.Д., Благодатская Е.В. Разделение грибного и бактериального субстрат-индуцированного дыхания с использованием

- антибиотиков в почвах разных экосистем // Микробиология. 2005. Т. 74. № 3. С. 336–342.
36. Умаров М.М. Роль микроорганизмов в устойчивости почв // Экология и почвы. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. 1998. С. 15-21.
 37. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М.: ГЕОС. 2007. 138 с.
 38. Урусевская И.С. Почвенные катены Нечерноземной зоны РСФСР // Почвоведение. 1990. № 9. С. 12–27.
 39. Хитров Н.Б., Лойко С.В. Структура почвенного покрова плоских водораздельных пространств каменной степи // Почвоведение. 2010. № 12. С. 1411-1423.
 40. Чевердин Ю.И. Изменения свойств почв юго-востока Центрального Черноземья под влиянием антропогенного воздействия. Воронеж: Изд-во «Истоки», 2013. 334 с.
 41. Ярославцев А.М., Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г., Судницын И.И. Микробное разложение хитина в почвах при различных уровнях влажности // Почвоведение. 2009. №7. С. 857-866.
 42. Acosta-Martínez V., Dowd S., Sun Y., Allen V. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. P. 2762–2770.
 43. Allers T., Mevarech M. Archaeal genetics – the third way // Nature Rev. Gen. 2005. V. 6. P. 58–73.
 44. Alvarez C.R., Alvarez R., Grigera M.S., Lavado R.S. Associations between organic matter fractions and the active soil microbial biomass // Soil Biology and Biochem. 1998. V. 30. P. 767-773.
 45. Amann R., Fuchs B.M., Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. V. 12. P. 231–236.
 46. Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogentic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. 1995. V. 59. P. 143-169.
 47. Amann R.I., Ludwig W. Ribosomal RNA Targeted Nucleic Acid Probes for Studies in Microbial Ecology // FEMS Microbiological Reviews. 2000. V. 24. P. 555-565.

48. Amano-Sato C., Akiyama S., Uchida M., Shimada K., Utsumi M. Archaeal distribution and abundance in water masses of the Arctic Ocean, Pacific sector // *Aquatic microbial ecology*. 2013. V. 69. P. 101-112.
49. Anderson J.P.E., Domsch K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // *Soil Biol. Biochem.* 1978. V. 10. P. 215-221.
50. Anderson J.P.E., Domsch K.H. Measurement of bacterial and fungal contribution to respiration of selected agricultural soils // *Canad. J. Microbiol.* 1975. V. 21. P. 314–322.
51. Anderson T.-H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality // *Agric. Ecosyst. Environ.* 2003. V. 98: P. 285–293.
52. Anderson T.-H., Martens R. DNA determinations during growth of soil microbial biomasses // *Soil Biol. Biochem.* 2013. V. 57: P. 487–495.
53. Andersson A.F., Lindberg M., Jakobsson H., Bäckhed F., Nyren P., Engstrand L. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing // *PLoS ONE*. 2008. V. 3(7). e2836 (doi:10.1371/journal.pone.0002836).
54. Angel R., Claus P., Conrad R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions // *ISME Journal*. 2012. V. 6. P. 847–862.
55. Auguet J.-C., Barberan A., Casamayor E.O. Global ecological patterns in uncultured Archaea // *The ISME Journal*. 2010. V. 4. P. 182–190. (doi:10.1038/ismej.2009.109).
56. Bääth E., Anderson T.-H. Comparison of soil fungal / bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques // *Soil Biol. Biochem.* 2003. V. 35. P. 955-963.
57. Bachoon D.S., Otero E., Hodson R.E. Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization // *J. Microbiol. Methods* 2001. V. 47: P. 73–82.
58. Badalucco L., Pomaré F., Grego S., Landi L., Nannipieri P. Activity and degradation of streptomycin and cycloheximide in soil // *Biol. Fertil. Soils*. 1994. V. 18. P. 334–340.
59. Bailey V.L., Smith J.L., Bolton H. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration // *Soil Biol. Biochem.* 2002. V. 34. P. 997–1007.

60. Bakken L.R., Frostegård Å. Nucleic Acid Extraction from Soil // Nucleic Acids and Proteins in Soil. Nannipieri P., Smalla K. (eds.), Soil Biology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. V. 8, P. 49-73.
61. Barberán A., Fernández-Guerra A., Auguet J.-C., Galand P.E., Casamayor E.O. Phylogenetic ecology of widespread uncultured clades of the Kingdom Euryarchaeota // Molecular Ecology. 2011. V. 20. P. 1988–1996. (doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05057.x).
62. Bardgett R.D., Hobbs P.J., Frostegard A., Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland // Biol. Fertil. Soils 1996. V. 22, P. 261–264.
63. Basak B.B., Biswas D.R. Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop // Biol. Fertil. Soils. 2010. V. 46. P. 641–648.
64. Bates S., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N., A global-scale survey of archaeal abundance and diversity in soils // ISME Journal. 2011. V. 5. P. 908-917.
65. Beck T., Joergensen R.G., Kandeler E., Makeschin F., Nuss E., Oberholzer H.R., Scheu S. An interlaboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass C // Soil Biol. Biochem. 1997. V. 29: P. 1023–1032.
66. Berg I.A., Kockelkorn D., Ramos-Vera W.H., Say R.F., Zarzycki J., Hügler M., Alber B.E., Fuchs G. Autotrophic carbon fixation in archaea // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 447-460.
67. Bergmann G., Bates S., Eilers K., Lauber C., Caporaso J., Walters W., Knight R., Fierer N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities // Soil Biology and Biochemistry. 2011. V.43. P. 1450-1455.
68. Bertaux J., Schmid M., Prevost-Boure N.C., Churin J.L., Hartmann A., Garbaye J., Frey-Klett P. In situ identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238 N. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 4243–4248. (doi: 10.1128/AEM.69.7.4243-4248.2003).
69. Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsman J., Roberts G.P., Goodman R.M. Molecular phylogeny of archaea from soil // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 277–282.

70. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review // *Biol. Fertil. Soils*. 2008. V. 45. P. 115–131.
71. Blagodatskaya E.V., Blagodatskii S.A., Anderson T.-H. Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils of natural and agricultural ecosystems // *Microbiology* 2003. V. 72: P. 744–749.
72. Blagodatskaya E., Blagodatsky S., Anderson T.-H., Kuzyakov Y. Microbial growth and carbon use efficiency in the rhizosphere and root-free soil // *PLoS ONE*. 2014. V. 9(4). e93282 (doi:10.1371/journal.pone.0093282).
73. Blainey P.C., Mosier A.C., Potanina A., Francis C.A., Quake S.R. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. e16626.
74. Blume E., Bischoff M., Reichert J., Moorman T., Konopka A., Turco R. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season // *Applied Soil Ecology*. 2002. V. 592. P. 1-11.
75. Boetius A., Ravensschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., A. Gieseke, Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // *Nature*. 2000. V. 407, P. 623–626.
76. Bomberg M., Jurgens G., Saano A., Sen R., Timonen S. Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizospheres developed in boreal forest humus microcosms // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. V. 43. P. 163–171. (doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01055.x)
77. Bomberg M., Montonen L., Timonen S. Anaerobic Eury- and Crenarchaeota inhabit ectomycorrhizas of boreal forest Scots pine // *European Journal of Soil Biology*. 2010. V. 46 (6). P. 356–364.
78. Bomberg M., Timonen S. Distribution of Cren- and Euryarchaeota in Scots pine mycorrhizospheres and boreal forest humus // *Microb. Ecol.* 2007. V. 54. P. 406–416. (doi:10.1007/s00248-007-9232-3).
79. Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N., Graham K.J., Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles // *Microb. Ecol.* 1998. V. 36, P. 1–12.
80. Brochier-Armanet C., Deschamps P., Lopez-Garcia P., Zivanovic Y., Rodriguez-Valera F., Moreira D. Complete-fosmid and fosmidend sequences

reveal frequent horizontal gene transfers in marine uncultured planktonic archaea // ISME Journal. 2011. V. 5. P. 1291–1302.

81. Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota // Nature Reviews Microbiology. 2008. V. 6. P. 245-252. (doi:10.1038/nrmicro1852).
82. Brock Biology of Microorganisms, 11th edn. M.T. Madigan, J.M. Martinko (Eds). Prentice Hall, 2006. 992 p.
83. Brookes P.C., Landman A., Pruden G., Jenkinson D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil // Soil Biol. Biochem. 1985. V. 17. P. 837-842.
84. Buckley D.H., Graber J.R., Schmidt T.M. Phylogenetic Analysis of Nonthermophilic Members of the Kingdom *Crenarchaeota* and Their Diversity and Abundance in Soils // Appl Environ Microbiol. 1998. V. 64. P. 4333–4339.
85. Cabello P., Roldán M.D., Moreno-Vivián C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea // Microbiology. 2004. V. 150. P. 3527-3546.
86. Cao P., Zhang L.M., Shen J.P., Zheng Y.M., Di H.J., He J.Z. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils // FEMS Microbiology Ecology. 2012. V. 80. P. 146-158.
87. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.
88. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 4516–4522.
89. Caracciolo A.B., Bottoni P., Grenni P. Fluorescence in situ hybridization in soil and water ecosystems: A useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure // Toxicological and Environmental Chemistry. 2010. V. 92 (3). P. 567-579.

90. Chaban B., Ng S.Y.M., Jarrell K.F. Archaeal habitats — from the extreme to the ordinary // *Can. J. Microbiol.* 2006. V. 52, P. 73–116.
91. Chelius M.K., Triplett E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. // *Microb Ecol.* 2001. V. 41. P. 252–263.
92. Conrad R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures, a review and a proposal // *Organic Geochemistry.* 2005. V. 36. P. 739–752.
93. Conrad R. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO) // *Microbiological reviews.* 1996. V. 60. P. 609–640.
94. Curtis T.P., Head I.M., Lunn M., Woodcock S., Schloss P.D., Sloan W.T. What is the extent of prokaryotic diversity? // *Philos. Trans. R. Soc. B* 2006. V. 361. P. 2023–2037.
95. 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 and Applied Microbiology.* 1999. V. 22. P. 434-444.
96. Dalal R.C., Allen D.E., Livesley S.J., Richards G. Magnitude and biophysical regulators of methane emission and consumption in the Australian agricultural, forest, and submerged landscapes: a review // *Plant and Soil.* 2008. V. 309. No 1-2. P. 43-76.
97. Damsté J.S.S., Schouten S., Hopmans E.C., van Duin A.C.T., Geenevasen J.A.J. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota // *J Lipid Res.* 2002. V. 43. P. 1641-1651.
98. De Bruijn F.J. Biological Nitrogen Fixation // *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture.* Ben Lugtenberg (Ed). Heidelberg, etc.: Springer Cham, 2015. 215-224 p.
99. de la Torre J.R., Walker C.B., Ingalls A.E., Könneke M., Stahl D.A. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol // *Environ. Microbiol.* 2008. V. 10. P. 810-818.
100. De Poorter, L. M. I., Geerts, W. G., Theuvenet, A. P. R. & Keltjens, J. T. Bioenergetics of the formyl-methanofuran dehydrogenase and heterodisulfide reductase reactions in *Methanothermobacter thermautotrophicus* // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 66–75.

101. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V. N., Suzina N. E, Trotsenko Y. A., Semrau J. D., Bares A. M., Panikov N. S., Tiedje J. M. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 955-969.
102. Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S., Liesack W. Phylogenetic analysis and in situ identification of *Bacteria* community composition in an acidic *Sphagnum* peat bog // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 2110–2117.
103. Dekas A.E., Poretsky R.S., Orphan V.J. Deep-Sea Archaea Fix and Share Nitrogen in Methane-Consuming Microbial Consortia // *Science.* 2009. V. 326. № 5951. P. 422-426.
104. DeLong E.F., Pace N.R. Environmental diversity of bacteria and archaea // *Syst. Biol.* 2001. V. 50(4). P. 470–478.
105. DeLong, E.F. Archaea in coastal marine environments // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 5685–5689.
106. Demergasso C., Casamayor E.O., Chong G., Galleguillos P., Escudero L., Pedrós-Alió C. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004. V. 48: P. 57–69.
107. Dilly O. Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter // *Soil Biology and Biochemistry.* 2001. V. 33. P. 117-127.
108. Domsch K. H., Beck T. H., Anderson J. P. E., Söderström B., Parkinson D., Trolldenier G. A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies // *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 1979. V. 142. P. 520–533. (doi: 10.1002/jpln.19791420322)
109. Dorn E., Hellwig M., Reineke W., Knackmuss H.J. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad // *Arch. Microbiol.* 1974. V. 99. P. 61–70.
110. Dos Santos P.C., Fang Z., Mason S.W., Setubal J.C., Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 162-174 (DOI: 10.1186/1471-2164-13-162).
111. Dridi B., Fardeau M.-L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic

- archaeon isolated from human faeces // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1902–1907. (doi: 10.1099/ijs.0.033712-0)
112. Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage // *Science*. 2000. V. 287. P. 1796–1799.
 113. Ehrhardt C.J., Haymon R.M., Lamontagne M.G., Holden P.A. Evidence for hydrothermal archaea within the basaltic flanks of the East Pacific Rise // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 900–912.
 114. Eickhorst T., Tippkötter R. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH) // *Soil Biology and Biochemistry*. 2008. V. 40. P. 1883-1891.
 115. Eilers K.G., Lauber C.L., Knight R., Fierer N. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. V. 42. P. 896-903.
 116. Erguder T.H., Boon N., Wittebolle L., Marzorati M., Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. P. 855-869.
 117. Ferry J.G. How to make a living by exhaling methane // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 453–473.
 118. 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. V. 71(7). P. 4117–4120.
 119. Fierer N., Bradford M., Jackson R. Toward an ecological classification of soil bacteria // *Ecology*. 2007. V. 88. P. P. 1354-1364.
 120. Fischer D., Uksa M., Tischler W., Kautz T., Kopke U., Schloter M. Abundance of ammonia oxidizing microbes and denitrifiers in different soil horizons of an agricultural soil in relation to the cultivated crops // *Biol Fert Soils*. 2013. V. 49. P. 1243–1246.
 121. Fornasier F., Ascher J., Ceccherini M.T., Tomat E., Pietramellara G. A simplified rapid, low-cost and versatile DNA-based assessment of soil microbial biomass // *Ecol. Indic.* 2014. V. 45. P. 75–82.
 122. Franche C., Lindstrom K., Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants // *Plant and Soil*. 2009. V. 321. P. 35-59.

123. Frey S.D., Elliot E.T., Paustian K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients // *Soil Biol. Biochem.* 1999. V. 31. P. 573–585.
124. Frey S.D., Knorr M., Parrent J., Simpson R.T. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in a forest ecosystem // *Forest Ecol. Management.* 2004. V. 196. P. 159–171.
125. Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59 (11). P. 3605–3617.
126. Fuhrman J. A., McCallum K. Davis A. A. Novel major Archaeobacterial group from marine plankton // *Nature.* 1992. V. 356. P. 148–149.
127. Patel G.B., Sprot G.B. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. (“*Methanothrix concilii*”) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1990. V. 40. P. 79-82.
128. Gangneux C., Akpa-Vincesla M., Sauvage H., Desaire S., Houot S., Laval K. Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43: P. 431–437.
129. Gattinger A., Ruser R., Schloter M., Munch J. Microbial community structure varies in different soil zones of a potato field // *J. Plant Nutr.* 2002a. V. 165. P. 421–428.
130. Gattinger A., Schloter M., Munch., J. C. Phospholipid etherlipid and phospholipid fatty acid fingerprints in selected euryarchaeotal monocultures for taxonomic profiling // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002b. V. 213. P. 133-139.
131. Glöckner F.O., Fuchs B.M., Amann R. Bacterioplankton composition in lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65 (8). P. 3721-3726.
132. Gloor G.B., Hummelen R., Macklaim J.M., Dickson R.J., Fernandes A.D., MacPhee R., Reid G.. Microbiome Profiling by Illumina Sequencing of Combinatorial Sequence-Tagged PCR Products // *PLoS ONE.* 2010. V. 5(10). e15406. (doi:10.1371/journal.pone.0015406).
133. Goldfarb K.C., Karaoz U., Hanson C.A., Santee C.A., Bradford M.A., Treseder K.K., Wallenstein M.D., Brodie E.L. Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance //

Frontiers in Microbiology. 2011. V. 2. 10 p.
(<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00094>)

134. Gong P., Guan X., Witter E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption // *Appl. Soil. Ecol.* 2001. V. 17. P. 285–289.
135. Gubry-Rangin C., Nicol G.W., Prosser J.I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. V. 74. P. 566–574.
136. Gupta R., Shami A. Molecular signatures for the Crenarchaeota and the Thaumarchaeota // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2011. V. 99. P. P. 133-157.
137. Hallam S.J., Girguis P.R., Preston C.M., Richardson P.M., DeLong E.F. Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) Genes Associated with Methane-Oxidizing Archaea // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69 (9). P. 5483-5491.
138. Hallam S.J., Putnam N., Preston C. M., Detter J.C., Rokhsar D., Richardson P.M., DeLong E.F. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics // *Science.* 2004. V. 305. P. 1457–1462.
139. Hallam S.J., Konstantinidis K.T., Putnam N., Schleper C., Watanabe Y.-i., Sugahara J., Preston C., de la Torre J., Richardson P.M., DeLong E.F. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum* // *PNAS.* 2006. V. 103 (48). P. 18296-18301. (doi:10.1073/pnas.0608549103).
140. Hamady M., Walker J. J., Harris J. K., Gold N. J., Knight R. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex // *Nature Methods.* 2008. V. 5. P. 235–237.
141. Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile // *Applied and Environmental Microbiology.* 2008. V. 74. P. 1620-1633.
142. Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // *Microbiological reviews.* 1996. V. 60. P. 439–471.
143. Hart K.M., Kulakova A.N., Allen C.C.R., Simpson A.J., Oppenheimer S.F., Masoom H., Courtier-Murias D., Soong R., Kulakov L.A., Flanagan P.V., Murphy B.T., Kelleher B.P. Tracking the Fate of Microbially Sequestered Carbon Dioxide in Soil Organic Matter // *Environmental Science and Technol.* 2013. V. 47. 10. P. 5128-5137.

144. Hartmann M., Lee S., Hallam S.J., Mohn W.W. Bacterial, archaeal and eukaryal community structures throughout soil horizons of harvested and naturally disturbed forest stands // *Environmental Microbiology*. 2009. V. 11. P. 3045-3062.
145. Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., Richter A., Daims H., Wagner M. A moderately thermophilic ammoniaoxidizing crenarchaeote from a hot spring // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2008. V. 105 (6). P. 2134-2139.
146. He J.-Z., Hu H.-W., Zhang L.-M. Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils // *Soil Biology and Biochemistry*. 2012. V. 55. P. 146-154.
147. 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 // *Environmental Microbiology*. 2007. V. 9. P. 2364-2374.
148. Henckel T., Jäckel U., Schnell S., Conrad R. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane // *Applied Environmental Microbiology*. 2000. V. 66. No 5. P. 1801–1808.
149. Herndl G.J., Reinthaler T., Teira E., van Aken H., Veth C., Pernthaler A., Pernthaler J. Contribution of archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 2303-2309.
150. Hill G.T., Mitkowski N.M., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T., Nelson E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities // *Appl. Soil Ecol.* 2000. V. 15. P. 25-36.
151. Hirsch P.R., Gilliam L.M., Sohi S.P. Williams J.K., Clark I.M., Murray P.J., Starving the soil of plant inputs for 50 years reduces abundance but not diversity of soil bacterial communities // *Soil Biology and Biochemistry*. 2009. V. 41. P. 2021-2024.
152. Hoehler T. M., Alperin M. J., Albert D. B., Martens C. S. Apparent minimum free energy requirements for methanogenic Archaea and sulfate-reducing bacteria in an anoxic marine sediment // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001. V. 38. P. 33–41.

153. Hoehler T. M., Alperin M. J., Albert D. B., Martens C. S. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1998. V. 62. P. 1745–1756.
154. Hogberg M.N., Hogberg P., Myrold D.D. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? // *Oecologia*. 2007. V. 150. P. 590–601.
155. Hoj L., Rusten M., Haugen L., Olsen R., Torsvik V. Effects of water regime on archaeal community composition in Arctic soils // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 984–996. (doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00982.x).
156. Hollister E.B., Engledow A.S., Hammett A.J.M., Provin T.L., Wilkinson H.H., Gentry T.J. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments // *The ISME Journal*. 2010. V. 4. P. 829–838. (doi:10.1038/ismej.2010.3).
157. Holmes A.J., Roslev P., McDonald I.R., Iversen N., Henriksen K., Murrell J.C. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake // *Applied Environmental Microbiology*. 1999. V. 65. P. 3312–3318.
158. Hong J.K., Kim H.J., Cho J.C. Novel PCR Primers for the Archaeal Phylum *Thaumarchaeota* Designed Based on the Comparative Analysis of 16S rRNA Gene Sequences // *PLoS One*. 2014; V. 9: e96197.
159. Huber J.A., Mark Welch D.B., Morrison H.G., Huse S.M., Neal P.R., Butterfield D.A., Sogin M.L. Microbial population structures in the deep marine biosphere // *Science*. 2007. V. 318 (5847). P. 97–100.
160. Ingham E.R., Horton K.A. Bacterial, fungal and protozoan responses to chloroform fumigation in stored soil // *Soil Biol. Biochem.* 1987. V. 19. P. 545–550.
161. Jangid K., Williams M.A., Franzluebbbers A.J., Sanderlin J.S., Reeves J.H., Jenkins M.B., Endale D.M., Coleman D.C., Whitman W.B., Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems // *Soil Biology and Biochemistry*. 2008. V. 40, P. 2843–2853.
162. Jenkinson D.S., Powlson D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil – V. A method for measuring soil biomass // *Soil Biol. Biochem.* 1976. V. 8. P. 209-213.

163. Jia Z.J., Conrad R. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil // *Environmental Microbiology*. 2009. V. 11. P. 1658-1671.
164. Joergensen R.G., Emmerling C. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2006. V. 169: P. 295–309.
165. Joergensen R.G., Mueller T. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EN} value // *Soil Biology and Biochemistry*. 1996. V. 28. P. 33-37.
166. Jones R., Robeson M., Lauber C., Hamady M., Knight R., Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses // *ISME J.* 2009. V. 3: P. 442–453.
167. Jurgens G., Lindström K., Saano A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 803–805.
168. Sowers K.R., Ferry J.G. Isolation and Characterization of a Methylophilic Marine Methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 45 (2). P. 684-690.
169. Kabir S., Rajendran N., Amemiya T., Itoh K. Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using realtime polymerase chain reaction // *J. Biosci. Bioeng.* 2003. V.96: P. 337–343.
170. Kaiser E.-A., Mueller T., Joergensen R.G., Isam, H., Heinemeyer O. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter // *Soil Biol. Biochem* 1992. V. 24: P. 675–683.
171. Kammann C., Hepp S., Lenhart K., Müller C. Stimulation of methane consumption by endogenous CH₄ production in aerobic grassland soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2009. V. 41. № 3. P. 622-629.
172. Kartal B., Van Niftrik L., Keltjens J.T., Op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M. Anammox – growth physiology, cell biology, and metabolism // *Adv. Microb. Physiol.* 2012. V. 60. P. 211–262 (DOI: 10.1016/B978-0-12-398264-3.00003-6).
173. Kates M. Lipids of Archaea // *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Kates, M., Kushner, D.J. and Matheson, A.T. (eds.). New York: Elsevier, 1993. P. 261-295.

174. Kemnitz D., Kolb S., Conrad R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil // *FEMS Microbiology Ecology*. 2007. V. 60. P. 442-448.
175. Kendall M.M., Wardlaw G.D., Tang C.F., Bonin A.S., Liu Y., Valentine D.L. Diversity of *Archaea* in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivation of methanogens and a description of *Methanogenium boonei*, sp. nov // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73, P. 407–414.
176. Killham K., Prosser J.I. *The Prokaryotes // Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Ed. by E.A. Paul. 3rd ed. Amsterdam etc.: Elsevier, 2007. P. 119-144.
177. Kletzin A. General characteristics and important model organisms // *Archaea: Molecular and Cellular Biology*. Ed. by R. Cavicchioli. Washington, DC: ASM, 2007. P. 14–92.
178. 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 Research*, 2012, P. 1–11. (doi:10.1093/nar/gks808).
179. Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annu.Rev. Microbiol.* 2009. V. 63. P. 311–334.
180. Kolb S., Knief C., Stubner S., Conrad R.. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69: P. 2423–2429.
181. Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature*. 2005. V. 437: P. 543–546.
182. Koper T.E., Stark J.M., Habteselassie M.Y., Norton J.M. Nitrification exhibits Haldane kinetics in an agricultural soil treated with ammonium sulfate or dairy-waste compost // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. V. 74. P. 316-322.
183. Kravchenko I., Kizilova A., Menko E., Sirin A. Methane Cycling Microbial Communities in Natural and Drained Sites of Taldom Peatland, Moscow Region, Russia // *Annual Research and Review in Biology*. 2015. V. 6.2. P. 121-132.
184. Kubota K. CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications // *Microbes and Environ.* 2013. V. 28 (1). P. 3–12.

185. Kubota K., Imachi H., Kawakami S., Nakamura K., Harada H., Ohashi A. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens // *J. Microbiol. Methods*. 2008. V. 72. P. 54–59.
186. Kubota K., Ohashi A., Imachi H., Harada H. Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA- FISH) // *J. Microbiol. Methods*. 2006. V. 66. P. 521–528
187. Küsel K., Wagner C., Drake H.L. Enumeration and metabolic product profiles of the anaerobic microflora in the mineral soil and litter of a beech forest // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999. V. 29. P. 91–103.
188. Kuzyakov Y. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods // *Soil Biol. Biochem.* 2006. V. 38. № 3. P. 425-448.
189. Kuzyakov Y., Shevtzova E., Pustovoytov, K. Carbonate re-crystallization in soil revealed by ¹⁴C labeling: Experiment, model and significance for paleo-environmental reconstructions // *Geoderma*. 2006. V. 131. P. 45–58.
190. Kysela D. T., Palacios C., Sogin M. L. Serial analysis of V6 ribosomal sequence tags (SARST-V6): a method for efficient, high-throughput analysis of microbial community composition // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. P. 356–364.
191. La Cono V., Smedile F., Ferrer M., Golyshin P.N., Giuliano L., Yakimov M.M. Genomic signatures of fifth autotrophic carbon assimilation pathway in bathypelagic Crenarchaeota // *Microb. Biotechnol.* 2010. V. 3. P. 595-606.
192. Lauber C. L., Hamady M., Knight R., Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 5111–5120.
193. Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. P. 2407–2415.
194. Le Mer J., Roger P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review // *European J. Soil Biology*. 2001. V. 37. P. 25-50.
195. Leigh J.A. Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2000. V. 2 (4). P. 125-131.
196. Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W. Archaea predominate among ammonia oxidizing prokaryotes in soils // *Nature*. 2006. V. 442. P. 806-809.

197. Levicnik-Höfferle S., Nicol G.W., Pal L., Hacin J., Prosser J.I., Mandic-Mulec I. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile // *FEMS Microbiology Ecology*. 2010. V. 74. P. 302-315.
198. Liesack W., Schnell S., Revsbech N.P. Microbiology of flooded rice paddies // *FEMS Microbiology Reviews*. 2000. V. 24 (5). P. 625–645.
199. Lin Q., Brookes P.C. Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume measurements of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils // *Soil Biol. Biochem.* 1999. V. 31. P. 1999–2014.
200. Lindsay W.L. Carbonate equilibria // *Chemical Equilibria in Soils*. Lindsay W.L. (Ed.). New York: Wiley, 1979. P. 78–84.
201. List of Prokaryotic Names. URL: <http://www.bacterio.cict.fr>
202. Liu Y., Whitman W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. V. 1125. P. 171–189.
203. Lloyd-Jones G., Hunter D.W.F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils // *Soil Biol. Biochem.* 2001. V. 33. P. 2053–2059.
204. Logue J.B., Burgmann H., Robinson C.T. Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria // *BioScience*. 2008. V. 58 (2): P. 103-113.
205. Löscher C.R., Kock A., Könneke M., LaRoche J., Bange H.W., Schmitz R.A. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing archaea // *Biogeosciences*. 2012. V. 9. P. 2419-2429.
206. Lübeck P.S., Hansen M., Sørensen J. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and in situ hybridization techniques // *FEMS Microbiology Ecology*. 2000. V. 33 (1). P. 11-19.
207. Lueders T., Chin K.-J., Conrad R., Friedrich M. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage // *Environmental Microbiology*. 2001. V. 3. P. 194–204. (doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00179.x).

208. Lupatini M., Suleiman A. K. A., Jacques R.J. S., Antonioli Z. I., Kuramae E.E., Camargo F.A.D. Soil-Borne bacterial structure and diversity does not reflect community activity in Pampa biome // PLoS ONE. 2013. 8(10): e76465. (doi: 10.1371/journal.pone.0076465).
209. Luton P.E., Wayne J.M., Sharp R.J., Riley P.W. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3521-3530. (doi: 10.1099/00221287-148-11-3521)
210. Macalady J.L., Vestling M.M., Baumler D., Boekelheide N., Kaspar C.W., Banfield J.F. Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid // Extremophiles. 2004. V. 8. P. 411–419.
211. Mancuso, C.A., Odham, G., Westerdahl, G., Reeve, J.N. and White, D.C. C15, C20, and C25 isoprenoid homologues in glycerol diether phospholipids of methanogenic archaeobacteria // J. Lipid Res. 1985. V. 26. P. 1120-1125.
212. Mandernack K.W., Kinne, C. A., Coleman D., Huang Y.-S., Freeman K.H., Bogner J. The biogeochemical controls of N₂O production and emission in landfill cover soils: the role of methanotrophs in the nitrogen cycle // Environmental Microbiology. 2000. V. 2. P. 298–309. (doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00106.x).
213. Manz W., Arp G., Schumann-Kindel G., Szewzyk U., J.R. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue // Journal of Microbiological Methods. 2000. V. 40 (2). P. 125–134.
214. Marstorp H., Witter E. Extractable dsDNA and product formation as measures of microbial growth in soil upon substrate addition // Soil Biol. Biochem. 1999. V. 31 (10). P. 1443–1453.
215. Martens R. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations // Biol. Fertil. Soils. 1995. V. 19. P. 87-99.
216. Martens-Habbena W., Berube P.M., Urakawa H., de la Torre J.R., Stahl D.A. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria // Nature. 2009. V. 461. P. 976-979.
217. Martin-Cuadrado A.-B., Rodriguez-Valera F., Moreira D., Alba J.C., Ivars-Martinez E., Henn M.R., Talla E., Lopez-Garcia P. Hindsight in the relative abundance, metabolic potential and genome dynamics of uncultivated marine archaea from comparative metagenomic analyses of bathypelagic plankton of different oceanic regions // ISME Journal. 2008. V. 2. P. 865-886.

218. Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., JGermon. C., Soulas G., Catroux G.. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 2354–2359.
219. Mathai J.C., Sprott G.D., Zeidel M.L. Molecular mechanisms of water and solute transport across archaeobacterial lipid membranes // *J. Biol Chem.* 2001. V. 276. P. 27266–27271.
220. Maxfield P.J., Hornibrook E.R.C., Evershed R.P. Estimating High-Affinity Methanotrophic Bacterial Biomass, Growth, and Turnover in Soil by Phospholipid Fatty Acid ¹³C Labeling // *Applied Environmental Microbiology.* 2006. V. 72. No 6. P. 3901-3907.
221. Mehta M.P., Baross J.A. Nitrogen fixation at 92°C by a hydrothermal vent archaeon // *Science.* 2006. V. 314. No 5806. P. 1783-1786.
222. Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel V., Blumenberg M., Knittel K., Gieseke A., Peterknecht K., Pape T., Boetius A., Amann R., Jørgensen B.B., Widdel F., Peckmann J., Pimenov N.V., Gulina M.B. Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane // *Science.* 2002. V. 297 (5583). P. 1013-1015. (DOI: 10.1126/science.1072502)
223. Midgley D.J., Saleeba J., Stewart M., McGee P. Novel soil lineages of Archaea are present in semi-arid soils of eastern Australia // *Can. J. Microbiol.* 2007. V. 53. P. 129–138. (doi: 10.1139/W06-104).
224. Mikkonen A., Santalahti M., Lappi K., Pulkkinen A.-M., Montonen L., Suominen L. Bacterial and archaeal communities in long-term contaminated surface and subsurface soil evaluated through coextracted RNA and DNA // *FEMS Microbiology Ecology.* 2014. V. 90. No 1. P. 103-114.
225. Miltner A., Kopinke F-D., Kindler R., Selesi D., Hartmann A., Kästner M. Non-phototrophic CO₂ fixation by soil microorganisms // *Plant and Soil.* 2005. V. 269. P. 193–203.
226. Milucka J., Ferdelman T.G., Polerecky L., Franzke D., Wegener G., Schmid M., Lieberwirth I., Wagner M., Widdel F., Kuypers M.M.M. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation // *Nature.* 2012. V. 491: P. 541–546. (doi:10.1038/nature11656).
227. Molin S., Givskov M. Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity // *Environmental Microbiology.* 1999. V. 1. P. 383-391.

228. Mori K., Iino T., Suzuki K., Yamaguchi K., Kamagata Y. Aceticlastic and NaCl-requiring methanogen "*Methanosaeta pelagica*" sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 3416–3423.
229. Mueller T., Joergensen R.G., Meyer B. Estimation of soil microbial biomass C in the presence of living roots by fumigation-extraction // *Soil Biol. Biochem.* 1992. V. 24. P. 179-181.
230. Nakamura K., Terada T., Sekiguchi Y., Shinzato N., Meng X.-Y., Enoki M., Kamagata Y. Application of pseudomurein endoisopeptidase to fluorescence in situ hybridization of methanogens within the family *Methanobacteriaceae* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 6907–6913.
231. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. Microbial diversity and soil functions // *European J. Soil Sci.* 2003. V. 54. P. 655-670.
232. Nemergut D.R., Cleveland C.C., Wieder W.R., Washenberger C.L., Townsend A.R. Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest // *Soil Biology and Biochemistry.* 2010. V. 42. P. 2153-2160.
233. Neufeld J. D., Mohn W. W. Unexpectedly high bacterial diversity in arctic tundra relative to boreal forest soils, revealed by serial analysis of ribosomal sequence tags // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 5710–5718.
234. Neufeld J. D., Yu Z., Lam W., Mohn W. W. Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities // *Environ. Microbiol.* 2004. V. 6. P. 131–144.
235. Nicol G.W., Leininger S., Schleper C., Prosser J.I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria // *Environmental Microbiology.* 2008. V. 10. P. 2966-2978.
236. Nicol G.W., Tscherko D., Chang L., Hammesfahr U., Prosser J.I. Crenarchaeal community assembly and microdiversity in developing soils at two sites associated with deglaciation // *Environmental Microbiology.* 2006. V. 8. P. 1382-1393.
237. Nicol G.W., Webster G., Glover L.A., Prosser J.I. Differential response of archaeal and bacterial communities to nitrogen inputs and pH changes in

- upland pasture rhizosphere soil // *Environmental Microbiology*. 2004. V. 6. P. 861-867.
238. Nicol G.W., Glover L., Prosser J. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil // *Environ. Microbiol.* 2003. V. 5. P. 152–162. (doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00399.x)
239. Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H., Chee G.-J., Hattori M., Kanai A., Atomi H., Takai K., Takami H. Insights into the evolution of *Archaea* and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 3204–3223
240. Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR // *Environmental Microbiology*. 2003. V. 5. P. 787-797.
241. Offre P., Spang A., Schleper C. Archaea in Biogeochemical Cycles // *Annu. Rev. Microbiol.* 2013. V. 67. P. 437–57.
242. Okano Y., Hristova K.R., Leutenegger C.M., Jackson L.E., Denison R.F., Gebreyesus B., Lebauer D., Scow K.M.. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 1008–1016.
243. Oline D.K., Schmidt S.K., Grant M.C. Biogeography and landscape-scale diversity of the dominant Crenarchaeota of soil // *Microbial Ecol.* 2006. V. 52: P. 480–490.
244. Oren A., Steinberger Y. Coping with artifacts induced by $\text{CaCO}_3\text{--CO}_2\text{--H}_2\text{O}$ equilibria in substrate utilization profiling of calcareous soils // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. P. 2569–2577.
245. Orphan V.J., House C.H., Hinrichs K.U., McKeegan K.D., DeLong E.F. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis // *Science*. 2001. V. 293. P. 484–487.
246. Osborn A., Moore E., Timmis K. An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics // *Environ. Microbiol.* 2000. V. 2. P. 39–50.
247. Park B.-J., Park S.-J., Yoon D.-N., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., Rhee S.-K., Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine

- sediments in co-culture with sulfur-oxidizing bacteria // Applied and Environmental Microbiology. 2010. V. 76. P. 7575–7587.
248. Paul K., Nonoh J.O., Mikulski L., Brune A. “*Methanoplasmatales*,” *Thermoplasmatales*-related Archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 8245–8253.
249. Penning H., Plugge C.M., Galand P.E., Conrad R. Variation of carbon isotope fractionation in hydrogenotrophic methanogenic microbial cultures and environmental samples at different energy status // Global Change Biol. 2005. V. 11. P. 2103–2113.
250. Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68 (6). P. 3094–3101.
251. Pesaro M., Widmer F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 42. P. 89–98. (doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00998.x).
252. Pester M., Schleper C., Wagner M. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology // Current Opinion in Microbiology. 2011. V. 14. P. 300–306.
253. Peters V., Conrad R. Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1673–1676.
254. Petersen S.O., Debosz K., Schjøning P., Christensen B.T., Elmholt S. Phospholipid fatty acid profiles and C availability in wet-stable macro-aggregates from conventionally and organically farmed soils // Geoderma 1998 V. 78. P. 181–196.
255. Pietramellara G., Ascher J., Borgogni F., Ceccherini M.T., Guerri G., Nannipieri P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance // Biol. Fertil. Soils. 2009. V. 45. P. 219–235.
256. Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A. Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by In Situ Hybridization // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66 (7). P. 3073-3077.
257. Pitcher A., Rychlik N., Hopmans E.C., Spieck E., Rijpstra W.I.C., Ossebaar J., Schouten S., Wagner M., Damsté J.S.S. Crenarchaeol dominates the

membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic Group I.1b Archaeon // ISME Journal. 2010. V. 4. P. 542-552.

258. Poplawski A.B., Mårtensson L., Warttinen I., Rasmussen U. Archaeal diversity and community structure in a Swedish barley field: specificity of the EK510R/ (EURY498) 16S rDNA primer // J. Microbiol. Methods. 2007. V. 69. P. 161–173. (doi:10.1016/j.mimet.2006.12.018).
259. Poulsen M., Schwab C., Jensen B.B., Engberg R.M., Spang A., Canibe N., Højberg O., G. Milinovich, Fragner L., Schleper C., Weckwerth W., Lund P., Schramm A., Urich T. Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen // Nat. Commun. 2013. V. 4 (1428). (doi:10.1038/ncomms2432).
260. Pratscher J., Dumont M.G., Conrad R. Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 4170-4175.
261. Price P. B., Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 4631–4636.
262. Prosser J.I., Bohannon B.J.M., Curtis T.P., Ellis R. J., Firestone M.K., Freckleton R.P., Green J.L., Green L.E., Killham K., Lennon J.J., Osborn A.M., Solan M., van der Gast C.J., Young J.P.W. The role of ecological theory in microbial ecology // Nature Reviews Microbiology. 2007. V. 5. P. 384–392.
263. Prosser J.I., Nicol G.W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment // Environmental Microbiology. 2008. V. 10. P. 2931–2941. (doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01775.x).
264. Raeymaekers L. Basic principles of quantitative PCR // Mol. Biotechnol. 2000. V. 15. P. 115–122.
265. Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R., Blankenship R.E. The natural history of nitrogen fixation // Molecular Biology and Evolution. 2004. V. 21. P. 541–554.
266. Reeve J. N., Morgan R. M., Nolling J. Environmental and molecular regulation of methanogenesis // Water Sci. Technol. 1997. V. 36. P. 1–6.

267. Reichardt W., Mascarina G., Padre B., Doll J. Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 233–238.
268. Richter D., Markewitz D. How deep is soil? // *Bioscience.* 1995. V. 45. P. 600-609.
269. 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 peat lands // *FEMS Microbiology Ecology.* 2007. V. 60. P. 240-251.
270. Rousk J., Demoling L.A., Bääth E. Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria // *Microbial Ecol.* 2009. V. 58. P. 75–85.
271. Rumpel C., Kögel-Knabner I. Deep soil organic matter—a key but poorly understood component of terrestrial C cycle // *Plant and Soil.* 2011. V. 338. P. 143-158.
272. Ruppel S., Torsvik V., Daae F.L., Øvreås L., Rühlmann J. Nitrogen availability decreases prokaryotic diversity in sandy soils // *Biol Fertil Soils.* 2007. V. 43. P. 449–459.
273. Sagar K., Singh S.P., Goutam K.K. Konwar B.K. Assessment of five soil DNA extraction methods and a rapid laboratory-developed method for quality soil DNA extraction for 16S rDNA-based amplification and library construction // *J. Microbiol. Methods.* 2014. V. 97. P. 68–73.
274. Sandaa R.A., Enger O., Torsvik V. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal-contaminated soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 3293–3297.
275. Sangwan P., Chen X., Hugenholtz P., Janssen P.H. *Chthoniobacter flavus* *gen. nov., sp. nov.*, the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 5875-5881.
276. Santoro A.E., Buchwald C., McIlvin M.R., Casciotti K.L. Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia-oxidizing Archaea // *Science.* 2011. V. 333. P. 1282-1285.
277. Šantrůčková H., Bird M.I., Elhottová D., Novák J., Pícek T., Šimek M., Tykva R. Heterotrophic Fixation of CO₂ in Soil // *Microbial Ecology.* 2005. V. 49. P. 218–225.

278. Sapro R., Bagramyan K., Adams M.W.W. A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 7545–7550.
279. Scheu S. Automated measurement of the respiratory response of soil microcompartments: Active microbial biomass in earthworm faeces // Soil Biol. Biochem. 1992. V. 24. P. 1113–1118.
280. Schleper C., Holben W., Klenk H. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 321–323.
281. Schleper C., Jurgens G., Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea // Nature Reviews Microbiology. 2005. V. 3. P. 479–488.
282. Schloss P., Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil // PLOS Comput. Biology. 2006. V. 2. P. 786–793.
283. Schmidt H., Eickhorst T. Detection and quantification of native microbial populations on soil-grown rice roots by catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization // FEMS Microbiology Ecology. 2014. V. 87. P. 390-402.
284. Schmidt H., Eickhorst T. Detection and quantification of native microbial populations on soil-grown rice roots by catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization // FEMS Microbiology Ecology 2014. V. 87. P. 390-402.
285. Schmidt H., Eickhorst T. Spatio-temporal variability of microbial abundance and community structure in the puddled layer of a paddy soil cultivated with wetland rice (*Oryza sativa* L.) // Applied Soil Ecology 2013. V. 72, P. 93-102.
286. Schmidt H., Eickhorst T., Mussmann M. Gold-FISH: a new approach for the in situ detection of single microbial cells combining fluorescence and scanning electron microscopy // Systematic and Applied Microbiology. 2012. V. 35. P. 518-525.
287. Schmidt T.M. The maturing of microbial ecology // International Microbiology. 2006. V. 9 (3). P. 217–223.
288. Schouten S., Hopmans E.C., Baas M., Boumann H., Standfest S., Könneke M., Stahl D.A., Damsté J.S.S. Intact membrane lipids of “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” a cultivated representative of the cosmopolitan mesophilic group I crenarchaeota // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 2433-2440.

289. Shaw L.J., Nicol G.W., Smith Z., Fear J., Prosser J.I., Baggs E.M. *Nitrosospira* spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 214-222.
290. Shen J.-p., Zhang L.-m., Zhu Y.-g., Zhang J.-b., He J.-z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam // *Environmental Microbiology.* 2008. V. 10. P. 1601–1611. (doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01578.x).
291. Shendure J., Hanlee J. Next-generation DNA sequencing // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26: P. 1135–1145.
292. Shimmel S.M. Dark fixation of carbon dioxide in an agricultural soil // *Soil Sci.* 1987. V. 144. P. 20–23.
293. Six J., Frey S.D., Thiet R.K., Batten K.M. Bacterial and Fungal Contributions to Carbon Sequestration in Agroecosystems // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2006. V. 70. P. 555-569.
294. Smalla K., Cresswell N., Mendonca-Hagler L.C., Wolters A., van Elsas J.D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification // *J. Appl. Bacteriol.* 1993. V. 74 (1). P. 78–85.
295. Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? // *J. Microbiol. Methods.* 2008. V. 69 (3). P. 470–479.
296. Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 4742–4751.
297. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Mark Welch D., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere” // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 12115–12120. (doi: 10.1073/pnas.0605127103).
298. Southwick P.L., Ernst L.A., Tauriello E.W., Parker S.R., Mujumdar R.B., Mujumdar S.R., Clever H.A., Waggoner A.S. Cyanine dye labeling reagents — carboxymethylindocyanine succinimidyl esters // *Cytometry.* 1990, V. 11. P. 418-430.
299. Spang A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., Stahl D.A., Wagner M., Schleper C. Distinct gene set in

- two different lineages of ammoniaoxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota // Trends in Microbiology. 2010. V. 18. P. 331-340.
300. Sparling G.P., West A.W. A comparison of gas chromatography and differential respirometer methods to measure soil respiration and to estimate the soil microbial biomass // Pedobiologia. 1990. V. 34. P. 103–112.
301. Sprent J.I. The biology of nitrogen-fixing organisms. London, New York: McGraw-Hill, 1979. 196 p.
302. Stahl D.A., de la Torre J.R. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea // Annual Review of Microbiology. 2012. V. 66. P. 83–101.
303. Stahl P.D., Parkin T. B., Eash N.S. Sources of error in direct microscopic methods for estimation of fungal biomass in soil // Soil Biology and Biochemistry. 1995. V. 27 (8). P. 1091–1097.
304. Stamatiadis S., Doran J.W., Ingham E.R. Use of staining and inhibitors to separate fungal and bacterial activity in soil // Soil Biol. Biochem. 1990. V. 22. P. 81–88.
305. Strickland M.S, Rousk J. Considering fungal : bacterial dominance in soils – Methods, controls, and ecosystem implications // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 1385–1395.
306. Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreenTM detection // J. Microbiol. Methods. 2002. V. 50. P. 155–164.
307. Stursová M., Baldrian P. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity // Plant and Soil. 2011. V. 338. P. 99-110.
308. Teira E., Reinthaler T., Pernthaler A., Pernthaler 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.
309. Terrat S., Christen R., Dequiedt S., Lelievre M., Nowak V., Regnier T., Bachar D., Plassart P., Wincker P., Jolivet C., Bispo A., Lemanceau P., Maron P.-A., Mougél C., Ranjard L. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure // Microb. Biotechnol. 2012. V. 5. P. 135–141.
310. Thauer R.K., Shima S. Methane as fuel for anaerobic microorganisms // Annals of the New York Academy of Sciences. 2008. V. 1125. P. 158–170.

311. Thauer R.K. Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂ // *Current opinion in microbiology*. 2011. V. 14. P. 292–299.
312. Torstensson L. Role of microorganisms in decomposition // *Interaction between herbivores and the soil*. Ed. by R.J. Hance. London: Academic Press, 1980. P. 159–177.
313. Tourova T. P. Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses // *Microbiology*. 2003. V. 72. P. 389–402.
314. Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.-P., Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and *Amo*-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. P. 1985–1995.
315. Tsai Y.L., Olson B.H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57 (4). P. 1070–1074.
316. Upchurch R., Chiu C.Y., Everett K., Dyszynski G., Coleman D.C. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils // *Soil Biol. and Biochemistry*. 2008. V. 40. P. 1294–1305.
317. Valentine D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea // *Nature Reviews Microbiology*. 2007. V. 5. P. 316–323.
318. Valentine D.L., Chidthaisong A., Rice A., Reeburgh W.S., Tyler S.C. Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2004. V. 68. P. 1571–1590.
319. Van de Vossenberg J.L.C.M., Driessen A.J.M., Grant W.D., Konings W.N. Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration // *Extremophiles*. 1999. V. 3. P. 253–257.
320. Van de Vossenberg J.L.C.M., Driessen A.J.M., Konings W.N. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids // *Extremophiles*. 1998a. V. 2. P. 163–170.
321. Van de Vossenberg J.L.C.M., Driessen A.J.M., Zillig W., Konings W.N. Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae* // *Extremophiles*. 1998b. V. 2. P. 67–74.

322. Van de Vossenberg J.L.C.M., Ubbink-Kok T., Elferink M.G.L., Driessen A.J.M., Konings W.N. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea // *Mol. Microbiology*. 1995. V. 18. P. 925–932.
323. Van der Heiden M.G.A., Bardgett R.D., van Straalen N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems // *Ecol. Lett.* 2008. V. 11. P. P. 296–310.
324. Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C // *Soil Biology and Biochemistry*. 1987. V. 19. P. 703-707.
325. Vandekerckhove T.T.M., Coomans A., Cornelis K., Baert P., Gillis M. Use of the Verrucomicrobia-specific probe EUB338-III and fluorescent in situ hybridization for detection of “*Candidatus Xiphinematobacter*” cells in nematode hosts // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 3121–3125.
326. Vanderkerckhove T.T.M., Willems A., Gills M., Coomans A. Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum*-group species (Nematoda, Longidoridae) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiology*. 2000. V. 50. P. 2197–2205. (10.1099/00207713-50-6-2197).
327. Velvis H. Evaluation of the selective respiratory inhibition methods for measuring the ratio of fungal : bacterial activity in acid agricultural soils // *Biol. Fert. Soils*. 1997. V. 25. P. 354–360.
328. Vitousek P.M., Menge D.N.L., Reed S.C., Cleveland C.C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems // *Phil. Trans. R. Soc. B* 2013. V. 368. (DOI: 10.1098/rstb.2013.0119).
329. Völkl P., Huber R., Drobner E., Rachel R., Burggraf S., Trincone A., Stetter K.O. *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 2918–2926
330. Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinel N., Arp D.J. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 8818-8823.
331. Wallenius K., Rita H., Mikkonen A., Lappi K., Lindström K., Hortikoinen H., Raateland A., Niemi R.M. Effects of land use on the level, variation and

- spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities // *Soil Biology and Biochemistry*. 2011. V 43. P. 1464-1473.
332. Wardle D.A., Yeates G.W., Watson R.N., Nicholson K.S. Response of soil microbial biomass and plant litter decomposition to weed management strategies in maize and asparagus cropping systems // *Soil Biol. Biochem.* 1993. V. 25. P. 857-868.
333. Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B.M., Thomashow L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens // *Annual Rev. Phytopathol.* 2002 V. 40. P. 309–348.
334. West A.W., Sparling G.P., Grant W.D. Correlation between four methods to estimate total microbial biomass in stored, air-dried and glucoseamended soils // *Soil Biol. and Biochemistry*. 1986. V. 18. P. 569-576.
335. Whalen S.C, Reeburgh W.S., Barber V.A. Oxidation of methane in boreal forest soils – a comparison of 7 measures // *Biogeochemistry*. 1992. V. 16. P. 181-211.
336. Whitford M.F., Teather R.M., Forster R.J. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen // *BMC Microbiology*. 2001. V. 1:5. (DOI: 10.1186/1471-2180-1-5).
337. Whitman W., Coleman D., Wiebe W. Procaryotes: the unseen majority // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 6578–6583.
338. Will C., Thürmer A., Wollherr A., Nacke H., Herold N., Schrumpf M., Gutknecht J., Wubet T., Buscot F., Daniel R. Horizon-Specific Bacterial Community Composition of German Grassland Soils, as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76 (20). P. 6751-6759.
339. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1990. V. 87. P. 4576–4579.
340. Woese C.R., Magrum L.J., Fox G.E. Archaeobacteria // *J. Mol. Evol.* 1978. V. 11. P. 245–252.
341. Wolters V. Invertebrate control of soil organic matter stability // *Biol. Fert. Soils*. 2000. V. 31. P. 1-19.
342. Wrage N., Velthof G.L., van Beusichem M.L., Oenema O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide // *Soil Biology and Biochemistry*. 2001. V. 33. P. 1723-1732.

343. Wuchter C., Abbas B., Coolen M.J.L., Herfort L., van Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G.J., Middelburg J.J., Schouten S., Damsté J.S.S. Archaeal nitrification in the ocean // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 12317-12322.
344. Xia W., Zhang C., Zeng X., Feng Y., Weng J., Lin X., Zhu J., Xiong Z., Xu J., Cai Z., Jia Z. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil // *ISME Journal*. 2011. V. 5. P. 1226–1236. (doi:10.1038/ismej.2011.5)
345. Xia Z., Xu H., Chen G., Dong D., Bai E., Luo L. Soil N₂O production and the $\delta^{15}\text{N-N}_2\text{O}$ value: Their relationship with nitrifying/denitrifying bacteria and archaea during a growing season of soybean in northeast China // *European Journal Soil Biology*. 2013. V. 58. P. 73-80.
346. Yakimov M.M., Cono V.L., Smedile F., DeLuca T.H., Juarez S., Ciordia S., Fernandez M., Albar J.P., Ferrer M., Golyshin P.N., Giuliano L. Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (Central Mediterranean Sea) // *ISME Journal*. 2011. V. 5. P. 945–961. (doi: 10.1038/ismej.2010.1197).
347. Yamauchi K., Doi K., Yoshida Y., Kinoshita M. Archaeobacterial lipids — highly proton-impermeable membranes from 1, 2-diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocholine // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. V. 1146. P. 178–182.
348. Yu Z., Yu M., Morrison M. Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition // *Environ. Microbiol.* 2006 V. 8. P. 603–611.
349. Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E.J., Kloepper J.W. Application of rhizobacteria for induced resistance // *Eur. J. Plant Pathology*. 2001. V. 107 (1). P. 39–50.
350. Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review // *Biol. Fertil. Soils*. 1999. V. 29. P. 111-129.
351. Zelles L., Bai Q.Y., Beck T., Beese F. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils // *Soil Biol. Biochem.* 1992. V. 24, P. 317–323.
352. Zelles L., Rackwitz R., Bai Q.Y., Beck T., Beese F. Discrimination of microbial diversity by fatty acid profiles of phospholipids and lipopolysaccharides in differently cultivated soils // *Plant and Soil*. 1995. V. 170. P. 115–122.

353. Zhang L.-M., Offre P.R., He J.-Z., Verhamme D.T., Nicol G.W., Prosser J.I. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 17240-17245.
354. Zillig W., Stetter K.O., Wunderl S., Schulz W., Priess H., Scholz J. The *Sulfolobus* - "Caldariella" group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases // Archives of Microbiology. 1980. V. 125 (3). P. 259-269.
355. Zinder S.H. Physiological Ecology of Methanogens // Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics. Ed. by Ferry J.G. New York: Chapman & Hall, 1993. P. 128-206.
356. Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. P. 533-616.