

Сравнение разнообразия почвенного микробиома при создании агрономически ценной ассоциации для применения в сельском хозяйстве

*Анатолий Юницкий, Вера Заяц*¹, Иван Налетов и Никифор Зыль*

ЗАО «Струнные технологии», 222838, Минская обл., Пуховичский р-н, Новосёлковский с/с, 35, район ул. Зорный Шлях, г. Марьина Горка, Республика Беларусь.

Аннотация. В статье представлены данные метагеномного секвенирования нескольких образцов плодородных почв (мирового Банка почв Крестьянско-фермерского хозяйства «Юницкого» и дендропарка Белорусской государственной сельскохозяйственной академии). Анализ производился с помощью NovaSeq 6000. Проведена всесторонняя оценка микробного потенциала почв, наличие агрономически ценных микроорганизмов для дальнейшего использования в органическом земледелии. Изучен таксономический состав образцов плодородных почв, также определены преобладающие рода микроорганизмов. На основании полученных данных была подобрана и выделена ассоциация агрономически ценных бактерий, которая внедрена в комплексную органическую подкормку для растений эликсир плодородия «uTerra».

Введение

Постоянно растущая необходимость увеличения производства продуктов питания, топлива и других ресурсов для удовлетворения мирового спроса и достижения нулевого голода оказывает серьёзное давление на почву и её плодородный слой. Это происходит в первую очередь в виду использования интенсивных сельскохозяйственных технологий, предполагающих повышенные дозы минеральных удобрений, гербицидов, пестицидов и других агрохимикатов, которые при нерациональном применении вызывают деградацию почвы и нарушение биосферного равновесия.

Таким образом, деградированные и маргинальные земли со значительными сельскохозяйственными ограничениями являются результатом неадекватного

* Автор-корреспондент: v.zayats@unitsky.com

интенсивного возделывания земель, при котором уделяется недостаточно внимания к сохранению почв и изменению климата [1,2]. Продолжение использования почвы в сельскохозяйственном производстве часто требует всё большего использования внешних ресурсов, таких как минеральные удобрения и гербициды, что ещё больше усугубляет деградацию и препятствует рециркуляции и сохранению питательных веществ. Деградация почвы при этом представляет собой не только ускоренное разложение природного гумуса в почве, вымывание микро- и ультрамикрорезультатов, но и снижение её биоразнообразия.

Почвенные микроорганизмы играют важную роль в сельскохозяйственных системах, особенно микроорганизмы, способствующие росту растений (PGPM) [3]. Стимуляция роста растений такими организмами объясняется главным образом тремя механизмами:

- действуют как биоудобрения (азотфиксирующие и фосфатсольбилизирующие бактерии), способствуют усвоению питательных веществ растениями, обеспечивая фиксированный азот или другие питательные вещества;
- действуют как фитостимуляторы (микроорганизмы, экспрессирующие фитогормоны, например бактерии рода *Azospirillum*) могут напрямую стимулировать рост растений;
- агенты биологической защиты растений (например *Trichoderma*, *Pseudomonas* и *Bacillus*).

При лучшей обеспеченности растений биологическим азотом формируется большая ассимиляционная поверхность, увеличиваются фотосинтетический потенциал, чистая продуктивность фотосинтеза, накопление сухого вещества всеми органами растений и, в конечном счёте, урожай, белковая и микронутриентная продуктивность посевов. Биологическая фиксация азота (N_2) является процессом преобразования атмосферного азота в биодоступную форму, такую как аммоний (NH_4^+), который используется организмами (бактериями, водорослями, грибами и растениями) для синтеза органических соединений, включая белки и нуклеиновые кислоты [4].

Большинство агрономических почв содержат большие запасы общего фосфора, но фиксация и осаждение вызывают его дефицит и, в свою очередь, серьёзно ограничивают рост сельскохозяйственных культур. Восполнение фосфора, особенно в устойчивых производственных системах, остаётся серьёзной проблемой, поскольку оно в основном зависит от минерального состава почвы. Поэтому возрос интерес к поиску технологии, которая могла бы обеспечить растения достаточным количеством подвижного фосфора. Среди гетерогенных и естественно распространенных микроорганизмов, населяющих ризосферу, микроорганизмы, сольбилизирующие фосфаты занимают доминирующие позиции.

Понимание экологии почвы необходимо для формирования устойчивых экосистем, а также для восстановления нарушенной среды обитания. Почвенные микроорганизмы являются ключевым элементом плодородия природной почвы и играют важную роль в процессах почвенных экосистем, таких как круговорот питательных веществ, разложение органических веществ и биоремедиация. Поэтому, изучение микробиомного сообщества плодородных почв является актуальной задачей в области органического земледелия и поиске новых подходов к качественной и доступной пище.

Материалы и методы

Секвенирование проводилось в компании CeGat (г. Тюнбеген, Германия) с использованием NovaSeq 6000. Точность правильного считывания оснований 93.44%.

Относительная численность последовательностей для таксономических единиц и функций, а также индексы разнообразия и различия Брея-Кертиса были рассчитаны с использованием R.

На анализ было отправлено два образца почвенного микробиома, полученных из:

1. Мировой Банк почв (S3067Nr1 Soil bank) – г. Марьина Горка, Крестьянско-фермерское хозяйство «Юницкого». В Банке почв находятся образцы природных плодородных почв из 110 регионов 5 континентов планеты;

Мировой Банк почв, созданный на территории Крестьянского (фермерского) хозяйства «Юницкого», имеет общую массу порядка 100 тысяч килограмм и содержит всё природное разнообразие живых микроорганизмов.

Данный Банк почв создан из плодородных почв, не участвовавших в сельскохозяйственном севообороте и не подвергавшихся действию пестицидов, гербицидов и инсектицидов. Образцы для Банка почв были доставлены в Беларусь в течение 5-ти лет из более чем 110 регионов мира со всех континентов нашей планеты (кроме Антарктиды). Мировой Банк почв создан в научно-практических целях, для исследования симбиоза агрономически ценных микроорганизмов и последующего выделения целевых консорциумов, способных восстанавливать плодородие истощённых почв и эффективно использоваться в органическом земледелии.

2. Дендропарк (S3067Nr2 Arboretum) – г. Горки (Учреждения образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»), почвы дендрария не подвергаются интенсивному химическому земледелию более 170 лет.

В ходе исследования 10 миллионов исходных считываний были сопоставлены с базой данных белков RefSeq. Таксономическое распределение было выполнено с использованием алгоритма наименьшего общего предка (LCA) [5], реализованного в MEGAN6 Ultimate Edition. Исходя из полученных данных, была выбрана наиболее потенциально плодородная, с разнообразным микробиомом почва для дальнейшего выделения микроорганизмов для применения в сельском хозяйстве с целью восстановления плодородия земель, а также стимуляции роста растений.

Результаты и обсуждения

По результатам полученных данных удалось проанализировать состав микроорганизмов из образцов плодородных почв. В таблице 1 представлено распределение видов по царствам. Учитывались только таксоны с относительной численностью последовательностей свыше 0,01%.

Таблица 1. Процент считываний, относящихся к царствам Бактерии, Археи, Эукариотам и Вирусам.

Название образца	Бактерии	Археи	Эукариоты	Вирусы
S3067Nr1	98.89	0.35	0.24	0.01
S3067Nr2	98.27	0.21	1.16	0.02

По данным таблицы заметно, что в образцах доминируют бактериальные виды, в то время как S3067Nr2 чуть больше представителей царства Эукариоты, чем в S3067Nr1. Это, вероятно, связано с наличием в дендрарии большого разнообразия базидиальных грибов, относящихся к данному царству.

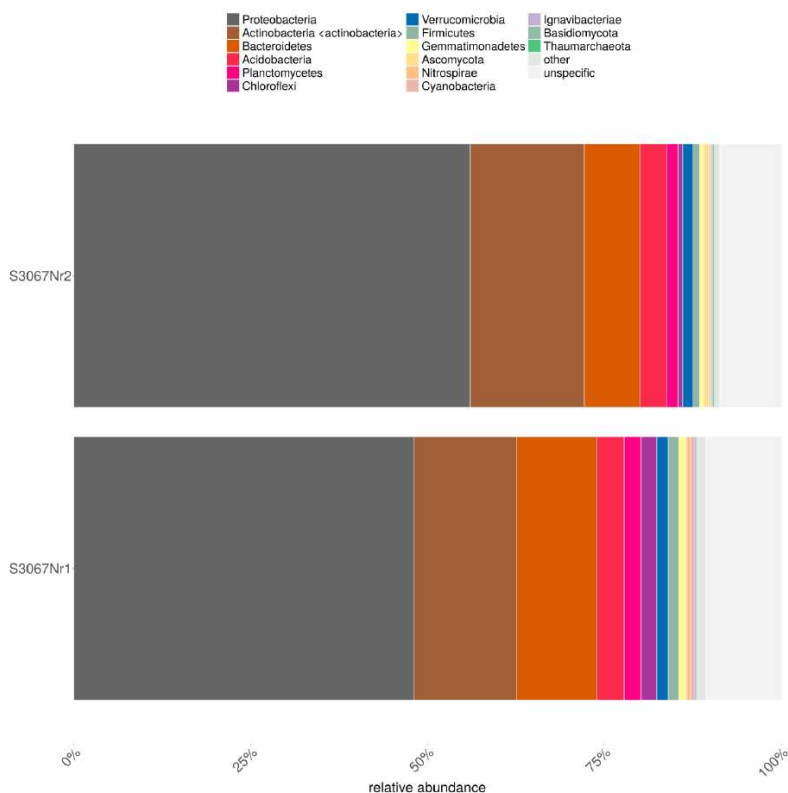


Рис. 1. Гистограмма относительной численности типов, присутствующих в каждом образце.

На рисунке 2 представлены наиболее доминирующие группы микроорганизмов. В образцах выявлены следующие типы: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroides, Acidobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Ascomycota, Nitrospirae, Cyanobacteria, Ignavibacteriae, Basidiomycota, Thaumarchaeota и другие менее численные представители таксономических групп.

Для оценки разнообразия образцов вычислялись два показателя разнообразия: Индекс Шеннона-Вайнера (HS) и равномерность (EH). HS является мерой общего числа видов, присутствующих в каждой выборке (богатство), и частоты их появления. Индекс увеличивается с количеством видов [6]. Равномерность выборки, оценивается от 0 до 1. Если все виды имеют одинаковую численность EH, то она близка к 1, но низка, если есть большие различия в численности видов в выборке.

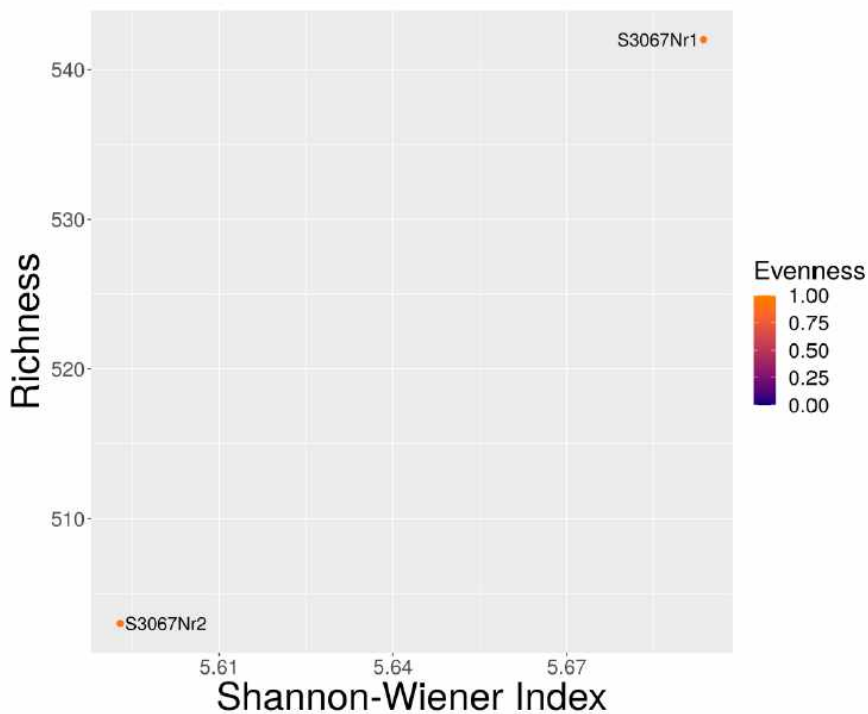


Рис. 2. Разнообразие видов в образцах

Образец S3067Nr1 значительно более богатый по количеству представителей различных видов. У двух различных почв доминирующим типом оказалось Proteobacteria или Pseudomonadota. Данный тип является основным у граммотрицательных бактерий. Pseudomonadota имеют большое разнообразие типов метаболизма, большинство из них являются факультативно или облигатно анаэробными, хемолитоавтотрофными и гетеротрофными организмами [7]. К данному типу относят обширный класс Alphaproteobacteria, который представляет собой разнообразный таксон и включает несколько фототрофных родов, несколько родов, метаболизирующих C1-соединения (например, *Methylobacterium* spp.), симбионтов растений (например, *Rhizobium* spp.), эндосимбионтов членистоногих (*Wolbachia*) и др [8]. К Альфапротеобактериям также относят и различные виды азотфиксирующих бактерий, одним из таких представителей является *Azospirillum* – аэробные организмы, но многие из них также могут функционировать как микроаэробные диазотрофы, то есть в условиях низкого содержания кислорода они могут превращать инертный азот из воздуха в биологически полезные формы. Хорошо растут в атмосфере воздуха в присутствии источника связанного азота, например соли аммония. Метаболизм, как правило, дыхательного типа с использованием в качестве конечного акцептора электронов кислорода, а у некоторых штаммов и NO_3^- [9]. Многие азоспириллы выделяют растительные гормоны, которые изменяют рост корней растений. У поражённых корней часто отрастают больше ветвей и тонких корневых волосков, что может помочь растениям более эффективно усваивать воду и питательные вещества. В дополнение к этим изменениям, азоспириллы также могут изменять формы питательных веществ для растений, таких как азот и фосфор, чтобы

сделать их более доступными для растений. Азоспириллы производят антиоксиданты, которые защищают корни растений от стрессов, вызванных засухой и наводнениями.

Следующая многочисленная представленная группа микроорганизмов – Acidobacteria [10]. Члены этого типа особенно многочисленны в почвенных средах обитания и составляют до 52% от общего бактериального сообщества. Большинство акцидобактерий считаются аэробами. Было обнаружено, что некоторые штаммы акцидобактериот, происходящие из почв, обладают геномным потенциалом для дыхания кислородом при атмосферных концентрациях. Представители типа Acidobacteriota считаются олиготрофными бактериями из-за их высокой численности в средах с низким содержанием органического углерода и устойчивостью к низкому значению pH окружающей среды.

Выводы

На основании вышеописанных результатов стоит отметить, что образец почвы S3067Nr1 обладает значительным потенциалом для изучения в области органического земледелия, имеет более высокое разнообразие различных видов микроорганизмов с функциональными метаболическими особенностями даже в сравнении с природной почвой, 170 лет не использовавшейся для сельского хозяйства. Таким образом, почва из мирового Банка почв является донором для выделения новых ассоциаций микроорганизмов, повышающих плодородие земель, улучшающих состояние растений и стимулирующее их рост и обладает высоким научным потенциалом для дальнейшего изучения микробиомов.

С применением вышеописанных данных создана подкормка жидкая органическая комплексная для растений эликсир плодородия «uTeга» [11, 12]. Эликсир плодородия «uTeга» изготавливается с использованием агрономически ценных почвенных микроорганизмов, выделенных из мирового Банка почв, путём биопротессинга реликтового ископаемого сырья (бурый уголь, горючие сланцы, торф), рассыпчатого биогумуса «uTeга», мелассы, мёда, природных элиситоров, морской соли, минеральных и органических элементов питания растений и других органических и минеральных компонентов.

Литература

1. А.Э. Юницкий, И.В. Налётков, В.С. Заяц. *Роль почвы в циркуляции макро- и микроэлементов между живыми организмами в изолированных замкнутых экосистемах*. Сборник материалов III международной научно-технической конференции «Безракетная индустриализация ближнего космоса: проблемы, идеи, проекты», 12 сентября 2020, Минск, Беларусь. (2020)
2. S. Mosier, S. Córdova, G. P. Robertson, *Front. sustain. food syst.* **5**, 76-102 (2021).
3. А.Э. Юницкий, Е.А.Соловьёва, Н.С. Зыль *Почва и почвенные микроорганизмы в биосфере ЭкоКосмоДома*. Сборник материалов II международной научно-технической конференции «Безракетная индустриализация ближнего космоса: проблемы, идеи, проекты», 21 июня 2019, Минск, Беларусь. (2019).
4. D. R. Steward, X. Yang, S. Y. Lauwo, S. A. Staggenborg, G. L. Macpherson, S. M. Welch, *Hydrol. Earth Syst. Sci.* **15**, 3181–3194 (2011).
5. B. Buchfink, C. Xie, D. H. Huson, *Nat. Methods.* **12**, 59–60 (2015).
6. J. Fukami, P. Cerezini, M. Hungria, *AMB Express* **8**, 73 (2018).
7. K. Lavrinenko, E. Chernousova, E. Gridneva, G. Dubinina, V. Akimov, J Kuever, *IJSEM* **12**, 2832-2837 (2010).

8. D. Trabelsi, D. Ridha, Biomed Res. Int. **2013**, 863240 (2013).
9. C. V. Hawkes, K. M. DeAngelis, M. K., The Rhizosphere, 1-29 (2007).
10. L. C Dincă, P. Grenni, C. Onet, A. Onet, Appl. Sci. **12**, 1198 (2022).
11. В. С. Заяц, И. В. Налетов, Е. А. Крюков, *Протекторная способность экзогенных элиситоров из Ganoderma lucidum при индукции солевого стресса у кресс-салата*, Настоящее и будущее биотехнологии растений, 24-26 мая 2023, Минск, Беларусь (2023).
12. И. В. Налётов, В. С. Заяц, *Минимальная ассоциация организмов для плодородия почвы*, Сборник материалов IV международной научно-технической конференции «Безракетная индустриализация ближнего космоса: проблемы, идеи, проекты», 18 сентября 2021, Минск, Беларусь (2021).