

Правительство Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
(СПбГУ)

УДК 63:579.64
Рег № НИОКТР
АААА-А19-119071790030-0
Инв. № 72750922

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
научных исследований СПбГУ

_____ Е.В. Лебедева
« » _____ 2022 г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Метагеномика в оценке экологических функций почв: анализ почвенной микробиоты
связанной с феноменом гигантизма растений черневой тайги Сибири
(заключительный)

По гранту РФФ
(№19-16-00049 от 06.05.2019 г.)

Руководитель НИР,
Профессор,
Кандидат биологических наук

А.Л. Лапидус

Санкт-Петербург
2022

РЕФЕРАТ

Отчет 27 с., 6 табл., 12 источн.

Ключевые слова: БИОИНФОРМАТИКА, СБОРКА ГЕНОМА, МЕТАГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА, АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Объектом исследования проекта «Метагеномика в оценке экологических функций почв: анализ почвенной микробиоты связанной с феноменом гигантизма растений черневой тайги Сибири» являлись сообщества микроорганизмов, населяющих уникальный тип сибирских лесов – черневую тайгу.

Целью работы являлось выявление и параметризация главных факторов, обуславливающих отличительные особенности экологических функций почв черневой тайги, таких как аномально повышенное эффективное плодородие и лесорастительные свойства. Научная задача проекта - получение новых фундаментальных знаний о связи особенностей черневой тайги с химическими показателями почвы, режимом увлажнения, своеобразием состава микробиоты, ее вкладом в продуктивность почв и/или всех факторов в совокупности.

В ходе выполнения проекта использовались полевые и лабораторные методы и подходы: различные почвенно-биологические методы, морфологические и молекулярно-генетические и микробиологические подходы, а также применялись современные биоинформатические и статистические подходы и методы анализа метагеномных данных.

В результате научно-исследовательских работ получен целый ряд приоритетных результатов, главный из которых - впервые проведено комплексное междисциплинарное исследования уникального региона России, эквивалента которому в мире нет. Также:

- Впервые проведены всестороннее описание и анализ свойств почвы, в которой произрастают высокорослые травы черневой тайги – уникального феномена с точки зрения продуктивности, морфологии и свойств.
- Впервые установлено, что высокорослые травы формируются в условиях своеобразной комбинации факторов педогенеза – биоклиматических и геогенных.
- Впервые проведен анализ микробиоты почв черневой тайги, включая бактериальный, архейный, грибной и протозойный компоненты с точки зрения выяснения причин их уникальной продуктивности и оценки перспектив практического использования их микробного потенциала в сельском хозяйстве.
- Целый ряд полученных результатов указывает на то, что именно микробиота черневой тайги обуславливает ее уникальную продуктивность по сравнению с действием физико-химических и агрохимических факторов.

Полученный обобщенный метагеномный портрет почв черневой тайги и смежных экосистем является стартовой точкой для детального исследования отдельных его составляющих. По результатам лабораторных вегетационных экспериментов проведена оценка перспективы мобилизации потенциала микробиоты почв черневой тайги в интересах сельского хозяйства, включая как стимуляцию роста растений, так и интенсификацию процессов разложения растительных остатков.

Эти перспективные исследования необходимо продолжать, т.к. знания конкретных механизмов воздействия тех или иных микроорганизмов на гигантизм травостоя очевидно должны быть использованы в интересах сельского хозяйства в результате создания искусственных микробных сообществ.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
СПИСОК ТАБЛИЦ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	21
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ	26

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете по НИР применяют следующие термины и сокращения с соответствующими определениями:

АМ — арбускулярная микориза;

БАС — биологически активные соединения природного происхождения;

БГК — биосинтетический генный кластер;

Микробиота — микроорганизмы, составляющие то или иное природное микробное сообщество;

Микробиом — совокупный геном природного микробного сообщества;

ITS — внутренний транскрибируемый спейсер (англ. Internal Transcribed Spacer, ITS);

MAG — геном собранный из метагенома (англ. Metagenome Assembled Genome);

НПК — азотно-фосфорно-калийные удобрения;

ONT — Oxford Nanopore, технология секвенирования третьего поколения;

РНК — рибосомальная РНК;

16S рРНК — рибосомальная РНК прокариот с коэффициентом седиментации 16 единиц Сведберга;

18S рРНК — рибосомальная РНК эукариот с коэффициентом седиментации 18 единиц Сведберга.

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица №	Название таблицы	Страница
1	Среднемаксимальные высоты генеративных побегов в условиях высокотравного осинового леса.	10
2	Среднемаксимальные высоты генеративных побегов в подтаежной зоне	11
3	Базовые статистики сборок отдельных проб	17
4	Затраченное время и оперативная память на сборку проб	17
5	Результаты количественного учета основных групп протистов в выборках 2020 и 2021 годов из Томской области методом МПН (наиболее вероятные числа) (экз. / г почвы естественной влажности).	19
6	Список изолятов голых амёб, выделенных из проанализированных проб почвы, отобранных в 2020 и 2021 годах, со значениями МПН (экз. / г почвы естественной влажности).	20

ВВЕДЕНИЕ

За все время развития биологии исследователи получили сведения не более чем о 3-х-5-ти процентах из триллиона видов живых существ, населяющих нашу планету. Большая часть из «Терра Инкогнита» приходится на бактерии, археи, грибы и протисты, которые являются по преимуществу педобионтами и гидробионтами. Метагеномика позволяет получать информацию о биоразнообразии и взаимодействиях внутри сложнейших, ранее не изученных экосистем, тем самым, содействуя разработке инновационных стратегий по охране и защите окружающей среды. При этом почва, как самый большой на планете резервуар биологической вариативности, содержит бактерии и грибы, которые являются источником ферментов и других молекул со значительной биохимической, промышленной и фармацевтической значимостью. Например, 70 % антибиотиков, используемых в настоящее время, получены из педобионтов. Очевидно, что более полное изучение свойств почвенных организмов, даст человечеству практически неисчерпаемый источник новых биологически активных молекул, в значительной степени превосходящий тот, который мог бы быть получен синтетическим путем.

Объектом исследования проекта впервые явилось сообщество микроорганизмов, населяющее почвы уникального типа сибирских лесов – черневую тайгу. Данный регион представляет собой уникальную бореальную лесную формацию, ограниченную в своем распространении гипергумидными секторами Алтае-Саянской горной области. Черневая тайга характеризуется целым рядом экологических особенностей, таких как совместное выраженное эдификаторное влияние осины (*Populus tremula*) и пихты (*Abies sibirica*) в древостое; присутствием крупных кустарников (*Sorbus sibirica*, *Padus avium*, *Salix caprea*), достигающих 18 метров в высоту и 30 см в диаметре; хорошо развитым сомкнутым травяным покровом, образованным высокотравными (до 4.5 метров) многолетними растениями; присутствием группы видов, относимых в Сибири к неморальным плиоценовым реликтам; практически полным отсутствием напочвенного мохового покрова.

Почвы черневой тайги представляют собой один из интереснейших, крайне мало изученных, объектов для метагеномных исследований, поскольку они демонстрируют целый ряд особенностей, в частности – исключительно высокие лесорастительные свойства при общей низкой концентрации гумуса (эффективное плодородие), необычно высокую скорость разложения растительных остатков и целый ряд других уникальных особенностей. Очевидно, что и продуктивность почв черневой тайги, и быстрые темпы разложения пожнивных остатков представляют собой комплекс связанных свойств, междисциплинарный анализ которого в рамках метагеномного исследования представляет собой серьезную фундаментальную задачу.

С практической точки зрения, глубокое изучение данного объекта может стать весьма важным источником целлюлозолитических штаммов, антибиотиков и других биологически активных молекул, имеющих фундаментальное и практическое значение.

Активное использование новых методов высокопроизводительного геномного секвенирования привело к лавинообразному увеличению данных о структуре микробных сообществ. Однако, большой объем и сложная структура этих данных в сочетании с

небольшим количеством собранных индивидуальных геномов представителей почвенных сообществ требуют разработки и применения разнообразных статистических методов для их обработки, а также применения методов функционального анализа. Именно анализ полных метагеномных данных в сочетании с новейшими статистическими моделями позволяет извлекать из них биологически значимую информацию, осуществлять переход от «описательной микробной экологии» к реконструкции взаимосвязей между отдельными членами микробного сообщества и метаболических путей трансформации используемых ими субстратов. В рамках проекта усовершенствованы ранее созданные и разработаны новые биоинформатические подходы анализа сложных микробных сообществ.

Таким образом, проект направлен на исследование феномена высокорослого травостоя на сравнительно бедных почвах и в умеренном климате; на изучение микробиотного компонента почвы черневой тайги; построение модели взаимоотношения между растительным и микробиотным компонентами почвенного сообщества; анализ микробиома почв сибирской черневой тайги на предмет поиска новых биологически активных соединений, на изучение факторов, определяющих эффективное плодородие почв. Дальнейшее развитие уже проведенных исследований причин гигантизма трав черневой тайги и детальный анализ накопленных данных могут быть использовано в целях повышения урожайности сельскохозяйственных культур экологически чистыми методами.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В рамках проекта впервые проведено комплексное междисциплинарное исследование уникального региона России, эквивалента которому нет в мире.

В его рамках впервые

- проведены описание и анализ свойств почвы, в которой произрастают высокорослые травы черневой;
- установлено, что они формируются в условиях своеобразной комбинации факторов педогенеза – биоклиматических и геогенных;
- проведен анализ микробиоты почв черневой тайги, включая бактериальный, архейный, грибной и протозойный компоненты с точки зрения выяснения причин их уникальной продуктивности;
- проведена оценка перспектив практического использования их микробного потенциала в сельском хозяйстве;
- получен обобщенный метагеномный портрет почв черневой тайги и смежных экосистем;
- по результатам лабораторных вегетационных экспериментов проведена оценка перспективы мобилизации потенциала микробиоты почв черневой тайги в интересах сельского хозяйства, включая как стимуляцию роста растений, так и интенсификацию процессов разложения растительных остатков.

Для получения этих данных были проведены полевые и лабораторные исследования почв, с помощью молекулярных и биоинформатических подходов и методов проведен анализ изучаемых микробиот.

1. Полевые исследования

1.1 Сбор проб

Для изучения микробиоты черневой тайги, были собраны образцы почвы и корней модельных видов растений черневой тайги (*Strepis sibirica* и *Aconitum septentrionale* - имеют высокий рост и мощные корневища в районах черневой тайги и обычный вид в контрольных районах) и контрольных точек Новосибирской и Томской областей. Собранная за все время выполнения гранта коллекция почвенных проб насчитывает 450 образцов из Новосибирской локации и 425 из Томской. Образцы почвы и ризосферы отбирались в разных точках, в разных профилях, в повторностях не менее десяти на точку. Из собранных проб была выделена ДНК для последующего изучения разнообразия и специфики почвенных микробиот методами ампликонного и полногеномного секвенирования. Для всех проб были получены данные сиквенса 16S, 18S, ITS последовательностей ДНК для проведения филогенетического анализа.

1.2 Полевые исследования почв

Одним из важных компонентов проекта является анализ свойств уникальной почвы черневой тайги, в которой произрастают высокорослые травы черневой тайги. Тем более, что почвы данного региона никогда не изучались в контексте феномена травяного гигантизма. Установлено, что они формируются в условиях своеобразной комбинации факторов педогенеза – биоклиматических и геогенных. В ходе выполнения проекта выявлено, что почвы черневой тайги относятся к текстурно-дифференцированным суглинистым или глинистым с выраженным мощным (мощностью до 50 см)

темногумусированным профилем. Высокое содержание гумуса и тяжелый гранулометрический состав почв черневой тайги обуславливают их повышенную влагоемкость (по все типам почвенно-гидрологических констант), по сравнению с почвами олиготрофных местообитаний. Это в свою очередь является одной из причин повышенной продуктивности экосистем. Поскольку эффективное плодородие почв не может осуществляться без присутствия в поровом пространстве достаточного количества влаги, повышенная влагоемкость почв черневой тайги является одним из почвенных факторов, обеспечивающих высокую продуктивность экосистем. Второй важнейший фактор – температура, которая в большей части профиля почв остается положительной в течение всего года, а не только в течение вегетационного периода, как это бывает в изученных почвах олиготрофных местообитаний. Проведенные термометрические измерения температуры подтвердили предположение о большей тепло-обеспеченности почв черневой тайги по сравнению с почвами олиготрофных местообитаний. Еще одним фактором формирования высоких параметров плодородия почв черневой тайги является их высокая гумусированность. Высокое содержание гумуса – само по себе важно для формирования плодородия почв. Но важно также и качество гумуса, который в почвах черневой тайги представлен существенным количеством ароматических фрагментов (по данным молекулярно-массового распределения и спектроскопии ядерного магнитного резонанса). Полициклические ароматические компоненты содержат повышенное количество свободных радикалов, которые, как предполагается, отвечают за биопротекторную функцию гумуса и способствуют стимулированию физиологических процессов у растений в корнеобитаемом слое.

1.3 Количественная оценка высокотравья

Высокотравные сообщества гумидных низкогорий Алтае-Саянской горной области имеют сложную пространственную структуру, образованную травянистыми многолетниками различного размера и жизненной формы. Наиболее характерной чертой высокотравных сообществ, определяющей их внешний облик, являются высокорослые травы, образующие верхний полог сообщества и достигающие высоты 2-3м и более. Среди этих травянистых «гигантов» есть виды, распространение которых ограничено исключительно или преимущественно областью распространения высокотравий в Сибири, но также в их составе присутствуют виды, встречающиеся далеко за пределами подпооя черневой тайги. Последняя группа видов интересна тем, что за пределами высокотравий размеры этих растений становятся существенно меньше.

Так как статистически достоверные промеры высокотравья никогда ранее не проводились, а оценивались преимущественно словами «гигант» или как «травы, скрывающие всадника на коне», была проведена количественная оценка высокотравья. В Таблице 1 представлены среднемаксимальные высоты генеративных побегов для условий высокотравного осинового леса.

Таблица 1. Среднемаксимальные высоты генеративных побегов в условиях высокотравного осинового леса.

	Среднее значение (см)	Максимальное значение (см)	Минимальное значение (см)
<i>Heracleum dissectum</i>	241,9±3,36	273	224
<i>Aconitum septentrionale</i>	241,2±3,78	277	205
<i>Cirsium helenioides</i>	212,5±4,30	272	190
<i>Bupleurum aureum</i>	212,2±8,29	232	193
<i>Crepis sibirica</i>	209,1±2,87	220	136

Несмотря на то, что максимальная высота генеративного побега отмечена для *Aconitum septentrionale*, среднее значение для *Heracleum dissectum* несколько выше. Борщевик рассеченный действительно выделяется среди представителей сибирского высокогорья не только высотой, но и мощностью генеративных побегов. Остальные измеренные виды имели несколько меньшие сходные показатели. *Bupleurum aureum* выделялся наибольшей величиной ошибки среднего, указывающей на значительный разброс данных. В Таблице 2 представлены среднемаксимальные высоты генеративных побегов для тех же видов растений в подтаежной зоне.

Таблица 2. Среднемаксимальные высоты генеративных побегов в подтаежной зоне.

	Среднее значение (см)	Максимальное значение (см)	Минимальное значение (см)
<i>Heracleum dissectum</i>	209,5±3,54	234	182
<i>Aconitum septentrionale</i>	193,7±5,93	255	157
<i>Cirsium helenioides</i>	168,6±7,28	214	118
<i>Bupleurum aureum</i>	133,7±2,90	157	114
<i>Crepis sibirica</i>	180,6±4,81	200	120

Как и в черневой тайге, наибольшие показатели отмечены для *Heracleum dissectum*, хотя абсолютный максимум высоты вновь измерен у *Aconitum septentrionale*. Если в черневой тайге наименьшие показатели были у *Crepis sibirica*, то в подтаежных лесах самые низкие генеративные побеги оказались у *Bupleurum aureum*, причем с наименьшей ошибкой, что свидетельствует о выровненности данных.

Для всех исследованных видов разница среднемаксимальной высоты генеративных побегов между двумя местообитаниями оказалась статистически значимой по критерию Стьюдента и составила от 28,5 до 78,5 см. Поскольку в анализ были включены представители трех различных семейств, различия между местообитаниями нельзя трактовать как специфическую реакцию отдельного вида или систематической группы. Полученные результаты в совокупности с другими данными дают основание считать, что разница в высоте генеративных побегов объясняется различиями в экологических условиях местообитаний.

2. Лабораторные исследования почв

В ходе исследований были оценены свойства почв черневой тайги, отобранной в двух локациях – Новосибирской и Томской областях, в качестве контроля использовалась зональная таежная почва, отобранная в тех же локациях. Кроме того, в различные годы выполнения проекта для сравнения были использованы черноземная почва (Воронежская обл.), дерново-подзолистая почва (Ленинградская обл., Вологодская обл.). Исследования почв черневой тайги развернулись в нескольких направлениях – исследования агрохимических особенностей почв, исследования продуктивности почв на нескольких сельскохозяйственных культурах, исследования потенциала почв при разложении целлюлозосодержащих субстратов, исследования почвенного микробиома в связи с продуктивностью при выращивании растений и при разложении целлюлозосодержащих субстратов, выделение в культуру отдельных бактериальных изолятов. Основной идеей исследований было понимание вклада микробного компонента в феномен высокой продуктивности черневой тайги.

С этой целью на первом этапе исследований была проведена сравнительная агрохимическая характеристика почв, их продуктивность и целлюлозолитическая активность. По результатам анализа агрохимических показателей было показано, что в

почве черневой тайги по сравнению с обычной лесной почвой более благоприятная величина рН_{сол} (5,6 против 4,68), больше обменных оснований (31,3 и 10,7 мг экв/100 г), выше содержание общего углерода (на 30%) и общего азота (в 2,7 раза), подвижного фосфора (в 3,2 раза). По сравнению с черноземом по данным показателям почва черневой тайги несколько уступает, хотя и не в значительной степени.

Однако по продуктивности почва черневой тайги показала статистически достоверное превосходство как над обычной лесной почвой того же региона, так и над черноземом. Так, сырой вес салата был для черневой тайги на 67,0% выше, чем для зональной почвы (36,3% для чернозема), овса (зеленая масса) – на 68,8% (– 74,6% для чернозема). Неожиданно низкие показатели продуктивности по салату для чернозема могут быть объяснены относительно высокими значениями рН, так как для салата наиболее благоприятными являются кислые почвы.

Подтвердилась и высокая целлюлозолитическая активность почвы черневой тайги. Было показано, что активность разложения целлюлозы в аппликационном опыте в почве черневой тайги выше, чем в обычной лесной почве того же региона, и в. Процент разложившейся целлюлозы для черневой тайги 63,2%, для чернозема 54,9%, для зональной почвы – 31,1%.

Для анализа таксономической структуры микробиоты трех почв (черневая тайга, зональная почва и чернозем) из всех почв была выделена ДНК в 6-ти повторностях, приготовлены ампликонные библиотеки по гену 16S рРНК и выполнено их высокопроизводительное секвенирование. По результатам таксономического анализа было идентифицировано более 7000 OUT (97%). На уровне бактериальных фил все три типа почв имели сходную таксономическую структуру. Абсолютной доминантой является пул неклассифицируемых прокариот, составляющих в отдельных случаях до 50% микробиома. Среди классифицируемых фил доминантами являются *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, что является весьма обычным для почвенных микробиомов.

С другой стороны, анализ взвешенного бета-разнообразия показал, что существуют четкие различия между тремя почвенными микробиотами, что свидетельствует о том, что различия в доминантных таксонах состоят в различной их представленности, а основные различия, связанные с наличием специфичных таксонов, приурочены к среднепредставленным и минорным компонентам.

На следующем этапе исследований были получены данные по разложению различных субстратов (листовой опад, солома) в почвах черневой тайги различного происхождения (Томск, Новосибирск), выделены специфические целлюлозолитические ассоциации из разложившегося субстрата на жидкой среде Гетчинсона и проведен анализ таксономической и функциональной структуры почвенной микробиоты в процессе разложения различных субстратов и целлюлозолитических ассоциаций, выделенных в культуру. По результатам анализа таксономической структуры микробных сообществ было выявлено более 4000 ASV, таксономически относящихся к 3 археотным и 20 бактериальным филам. Однако основной массив во всех сообществах составляли неклассифицируемые последовательности. Среди остальных доминантами являлись характерные для почвенных сообществ представители фил *Verrucomicrobiota*, *Proteobacteria*, *Planctomycetota*, *Nitrospirota*, *Myxococcota*, *Gemmatimonadota*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriot*, *Acidobacteriota*, *Crenarchaeota*, Примечательно, что даже на

уровне прокариотных фил можно видеть ясную разницу между всеми вариантами опытов, как связанных с разложением различных субстратов, так и с внесением дополнительных источников азота. По результатам анализа продемонстрировано несколько важных феноменов: 1) основным фактором дифференциации является тип почвы; 2), добавление НРК приводит не только к увеличению разнообразия (как было сказано выше), но и существенному сближению таксономических структур исходных новосибирских и томских сообществ, так что они формируют единый кластер с высокой статистической поддержкой; 3) солома производит несколько меньший «таксономический сдвиг», чем листовой опад (и это не удивительно, так как по химическому составу лиственной опад устроен более сложно, чем солома за счет лигниновых фракций); 4) микробное сообщество томской почвы черневой тайги в ходе разложения демонстрирует более высокие темпы дифференциации, чем новосибирская. Из полученных данных видно, что существенная часть доминант, выявленных в ассоциациях, имеет непосредственное отношение к главным «игрокам» микробных сообществ в процессе разложения целлюлозосодержащих субстратов: Xanthomonadaceae, Chitinophagaceae, Cytophagaceae.

В дополнительном эксперименте была изучена параллельная динамика микробиоты почвы черневой тайги при разложении трех контрастных субстратов – чистой целлюлозы (фильтровальная бумага), сосновых опилок и соломы ячменя при анализе высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек 16S рРНК (прокариотное сообщество) и ITS (грибное сообщество). Показано, что на каждом из проанализированных субстратов развивается весьма специфическое грибное и прокариотное сообщество с очевидными доминантами, как например, грибной род *Cirennalia* в случае опилок или в случае соломы – грибной род *Lecythyphora*. Из полученных данных видно, что таксонов, строго специфичных для определенного типа субстрата не много. Что важно, большинство из них относится к неидентифицируемым таксонам. Специфичным является, скорее, сам набор таксонов и их пропорции в каждом из субстратов. Таким образом, анализ грибных и прокариотных сообществ, развившихся в процессе разложения целлюлозосодержащих субстратов позволил лишь зафиксировать субстрат-специфичность данных сообществ, продемонстрировать несколько большую дифференциацию грибных сообществ по сравнению с бактериальными (что, возможно, свидетельствует о большей субстрат-специфичности грибных сообществ по сравнению с бактериальными), выявить специфику распределения таксонов в различных субстратах

Основной гипотезой проекта является предположение о том, что одним из факторов, обуславливающих высокую продуктивность почв черневой тайги, является их специфическая микробита. Очевидно, что перенос значительных количеств почвы черневой тайги с целью реализации его потенциала на сельхозугодьях, не имеет практического смысла, однако, перенесение небольших микробных фракций потенциально должно стать предметом более глубоких исследований с практической точки зрения. С этой целью был выполнен следующий эксперимент: семена редиса перед посадкой вымачивали в суспензии почвы черневой тайги (Томск) и высаживали в дерново-подзолистую почву (Ленинградская область). В качестве контроля, для исключения действия питательных веществ, находящихся в суспензии, для инокуляции использовали точно такую же суспензию, но приготовленную из почвы, прошедшей электронно-лучевую стерилизацию (18 кГрэй), причем полнота стерилизации контролировалась с помощью посева на питательные среды. Для постановки опыта в пластиковые ведерки объемом 2 л помещали

навески почв, влажность 60-70% от полной полевой влагоемкости. Сосуды поливали по весу. Навеска почвы по 1 кг на сосуд, повторность 3-х кратная. Vegetация проведена в течение 3-х недель в вегетационных домиках с поддержанием постоянной влажности по весу. По анализу массы корнеплодов показан статистически значимый эффект инокуляции и, вероятно, являющийся следствием имплантации микробиоты черневой тайги в ризосферу растений. Для анализа влияния компонентов микробиоты почвы черневой тайги на выявленный эффект были сопоставлены таксономические структуры ризосферных сообществ, сформированных на вариантах, инокулированных «живой» суспензией и на вариантах со стерильной суспензией, проанализированные с использованием высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек по гену 16S рРНК. Чтобы понять, какие функции выявленных дифференциально представленных сиквенс-вариантов могут обуславливать стимуляцию роста растений, для 9 представителей данного «топ-листа» был проведен поиск в базе PubMed соответствующих публикаций. Было выявлено несколько заслуживающих внимания находок: 1) *Lysinibacillus* – по участию бактерий этого вида в стимуляции роста растений существует обильная литература, которая касается как собственно стимуляции в обычных и стрессовых условиях, так и участия этого вида бактерий в защите растений от грибных фитопатогенов, а также в условиях повышенных концентраций цинка и кадмия; 2) *Chitinophagaceae* – довольно большое семейство почвенных микроорганизмов, среди которых по литературным данным встречаются и рост стимулирующие микроорганизмы, и микроорганизмы, подавляющие грибные патогены растений; 3) В семействе *Sphingobacteriaceae* выявлены микроорганизмы с большим потенциалом синтеза биоактивных компонентов, а также супрессии грибных патогенов.

В полном списке таксонов с преобладанием в ризосферном микробиоме растений, инокулированных «живой» суспензией, очевидно, найдется еще немало микроорганизмов с рост стимулирующей активностью, механизм которой, как становится понятно, может быть связан не только собственно со стимуляцией роста растений, например, биоактивными веществами, но и с супрессией патогенов, а также с адаптацией к стрессовым условиям.

Вывод о том, что в ризосфере растений на черневой почве значительно возрастает доля представителей *Bacilli*, *Verrucomicrobia*, *alpha-Proteobacteria*, *Actinobacteria*, подтверждается выделением в культуру бактериальных изолятов с высокой фитостимулирующей активностью, относящихся к pp. *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*. В то же время, значительную часть в составе ризосферного микробиома занимают нитрифицирующие археи *Nitrososphaera* и *Cand. Nitrosocosmius*, которые ранее не обнаруживались в ризосфере. Впервые обнаружены также некультивируемые бактерии *Cand. Saccharimonadia (Patescibacteria)*, которые предположительно являются симбионтами, и веррукомикробии *Candidatus Udaeobacter*. Влияние последних на рост растений неизвестно и может стать предметом молекулярного анализа их метаболизма (фитостимулирующего потенциала). Таким образом, состав ризосферной микрофлоры растений черневой почвы (диких, выращенных в лабораторных условиях) существенно отличается от такового у растений фоновой зональной почвы, что, вероятно, обуславливает их экстремальный рост (гигантизм).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов открывают путь к мобилизации микробного потенциала почв черневой тайги, что в свою очередь потребует

дальнейших исследований в нескольких направлениях. Такими направлениями, прежде всего, следует признать, выделение из ризосферы растений, инокулированных суспензиями почвы черневой тайги (в стерильном вегетационном опыте) штаммов-микроорганизмов в чистые культуры. С использованием полученного списка микроорганизмов-кандидатов на роль рост стимулирующих агентов, а также данных о нуклеотидных последовательностях их генов 16S рРНК можно спланировать эксперимент, в котором из множества выделенных штаммов необходимо будет отделить фракцию потенциальных рост стимуляторов. В отдельном эксперименте их реальные эффекты можно будет проанализировать.

Несколько сложнее ситуация с реализацией потенциала микробных сообществ почв черневой тайги в качестве агентов разложения целлюлозосодержащих растительных остатков. Двигаться дальше следует в направлении выделения в чистую культуру, целлюлозолитических организмов, но скорее всего, не отдельных микроорганизмов, а их ассоциаций, исследования их целлюлозолитического потенциала и перспектив их использования для создания микробных препаратов. Данные, полученные в настоящей работе, в особенности, по анализу дифференциальной представленности грибных и прокариотных таксонов в различных субстратах, могут быть также полезны для дальнейшей работы в этом направлении.

3. Молекулярные и биоинформатические подходы анализа микробиот

Проведены молекулярные исследования микробиоты ризосфер различных растений (редис, салат, пшеница). Показано, что в черневой почве значительно возрастает доля представителей *Bacilli*, *Verrucomicrobia*, *alpha-Proteobacteria*, *Actinobacteria*. Выделены бактериальные изоляты с высокой фитостимулирующей активностью, относящиеся к рр. *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*. Показано заметное присутствие в микробиоте ризосферы нитрифицирующих архей *Nitrososphaera* и *Cand. Nitrosocosmius*, которые ранее не обнаруживались в ризосфере. Впервые обнаружены некультивируемые бактерии *Cand. Saccharimonadia (Patescibacteria)*, которые возможно являются симбионтами, и веррукомикробии *Candidatus Udaeobacter*. Влияние последних на рост растений неизвестно и может стать предметом молекулярного анализа их метаболизма (фитостимулирующего потенциала).

В результате лабораторного микровегетационного эксперимент с кресс-салатом сорта Обильнолистный и редисом сорта Красный свет сформирована коллекция бактериальных (32 штамма) и грибных (7 штаммов) культур, характерных для корневой системы растений черни и отсутствующих в посевах из фоновой почвы. Обнаружено, что четыре бактериальные культуры (рр. *Azospirillum*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*) и две грибные (*Penicillium* и *Trichoderma*) увеличивали ростовые параметры и биомассу проростков пшеницы. При росте на почве черни наблюдали увеличение длины стеблей проростков в 1,2-1,5 раза, длины корней в 1,6-2.2 раза, веса проростков 1.4-1,7 раза.

Таким образом нами показано, что состав ризосферной микрофлоры растений черневой почвы (диких, выращенных в лабораторных условиях) существенно отличается от такового у растений фоновой зональной почвы.

Кроме того, из ризосферы растений в почве черневой тайги выделены бактериальные (4) и грибные (2) изоляты, обладающие фитостимулирующим воздействием и представляющими интерес при создании растительно-микробных

ассоциаций для экологически безопасного сельского хозяйства. Это делает их перспективным объектом для изучения как микробных драйверов плодородия, так и для разработки инновационных технологий повышения продуктивности почв и сельскохозяйственных культур, что составит предмет наших дальнейших исследований.

В результате микологического анализа образцов почв (bulk soils) черни и контролей методом посева на питательные среды показано, что численность и биомасса микроскопических грибов в почвах черневой тайги существенно выше, чем в аналогичных референтных почвах олиготрофных сосняков.

Несмотря на невысокую численность, видовой состав культивируемых грибов оказался весьма разнообразным. Из исследованных проб в чистую культуру было выделено более 100 изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов, которые были отнесены к 39 видам из 24 родов. Представители Mucoromycotina и Basidiomycota можно рассматривать как минорный компонент общего видового комплекса культивируемых грибов исследованных почв. Базидиомицеты представлены дрожжевыми грибами рода *Rhodotorula*, а муконовые представлены родами *Mucor* и *Umbeliopsis*.

Полученные результаты свидетельствуют о явном доминировании аскомицетов, как по числу выделенных и идентифицированных видов, так и по числу изолятов. Наибольшим видовым разнообразием характеризовались роды *Penicillium* (10 видов), и род *Cladosporium* (3 вида). Всего из почв черневой тайги выявлено 29 видов, из почв референтных сосняков 18 видов микромицетов. Только в почвах черневой тайги отмечены виды *Cephalotrichum microsporum*, *C. nanum*, *Cordyceps farinosa*, *Penicillium dierckxii*, *P. purpurescens*, *Trichoderma viride*. Виды рода *Trichoderma*, в частности, известны как стимуляторы роста растений, способные ограничивать распространение патогенных микроорганизмов и грибов.

Результаты исследования ферментативной активности изолятов почвенных грибов из черневой тайги или референтных сосняков показали, что лигнинолитические ферменты отмечены только у 5 изолятов (15 %). Лигнинолитическую активность показали виды *Aspergillus* sp., *Cosmospora butyri*, *Coniochaeta boothii*, *Gymnostellatospora japonica* выделенные из почв черневой тайги и *Gymnostellatospora japonica*, выделенный из почв референтных сосняков. Амилалитическая активность отмечена у 87 % исследованных изолятов. Способность разлагать целлюлозу отмечена у 81% изолятов. Таким образом, можно говорить о том, что большая часть изолятов, выделенных из почв черневой тайги, принимает участие в разложении целлюлозы и полисахаридов. При этом лишь сравнительно небольшая доля видов может рассматриваться как деструкторы лигнина.

В ходе проведенных лабораторных тестирований было отмечено, что степень лигнолитической и амиазной активности может незначительно варьировать у различных изолятов одного вида, выделенных из различных типов почв, что было показано для *Penicillium spinulosum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Umbelopsis vinacea*.

За время проекта из проб почвы, собранных в двух локациях черневой тайги и контрольных областей, из верхнего слоя, как наиболее богатого микроорганизмами, выделялась ДНК для полногеномного секвенирования совокупного генома микробиот (метагенома) технологиями Oxford Nanopore (ONT) и Illumina.

Суммарно за время проекта произведено 21 121 980 205 нуклеотидов ONT технологии и 1552 гигабайт Illumina данных, составивших в сумме более 100 терабайт (ТБ) данных.

При этом, для идентификации ВСЕХ геномов почвенной микробиоты данных требуется значительно больше!

Сборки длинных прочтений ONT выполнялись с помощью метагеномного сборщика metaFlye 2.9, разработанного при поддержке настоящего гранта. Для сборки коротких прочтений Illumina использовали сборщик metaSPAdes 3.15, а для гибридных сборок metaSPAdes 3.15.3 в гибридном режиме (данные Oxford Nanopore использовались для закрытия пробелов в покрытии данных Illumina, а также для разрешения повторов и скаффолдинга посредством запуска алгоритма hybridSPAdes).

Этапы сборок состояли из контроля качества прочтений, удаления служебных последовательностей (trimming) и собственно сборки. Для этого использовалась программа FastQC с оболочкой MultiQC.

Необходимо отметить, что сборка некоторых гибридных проб требовала более чем 512 Gb оперативной памяти, делая невозможным завершение процедуры сборки с учетом доступных ресурсов. Для снижения потребления памяти выполнена процедура фильтрации прочтений утилитой spades-cov-filter, с помощью которой убиралась все прочтения, с медианным покрытием 1, что автоматически уменьшило требования к памяти за счет уменьшения сложности входных данных: процедура фильтрации убрала все прочтения, относящиеся к микроорганизмам покрытия один.

Базовые статистики некоторых сборок приведены в таблице 3, а требуемые вычислительные ресурсы для сборки – в таблице 4.

Проба	N1_SU	N3_SU	T1_SP	T3_SP
# контигов (>= 1000 bp)	512764	266152	175832	721715
# контигов (>= 50000 bp)	363	144	33	1425
Длина (>= 1000 bp)	1404082114	539838141	3.1E+08	1.86E+09
Длина (>= 50000 bp)	35106701	13144078	2845333	1.42E+08
Самый длинный контиг	691423	331996	199 629	994 601
GC (%)	62.96	61.19	63.39	60.68
N50	1848	1003	787	1652
L50	247491	264189	317128	335808

Таблица 3: Базовые статистики сборок отдельных проб

Таблица 4: Затраченное время и оперативная память на сборку проб

Проба	Время сборки	Потребление памяти
N1_SU	125 часов	476 Gb
N3_SU	73 часа	274 Gb
T1_SP	28 часов	230 Gb
T3_SP	151 час	422 Gb

Кроме того производились негибридные сборки Illumina данных.

Несмотря на то, что гибридные сборки не очень сильно отличаются с точки зрения длин наиболее длинных контигов (скорее всего, эта длина ограничена процедурой пробоподготовки), суммарная длина сборки в контигах длины > 5 Kbp у гибридных сборок заметно выше. Данный факт позволяет получить гораздо более точные результаты

относительно составов метагеномов, равно как и улучшить дальнейший анализ (бининг и сборку MAG).

В рамках проекта разработан и реализован ряд новых биоинформатических инструментов для поиска биологически активных природных соединений (БАС) и синтезирующих их биосинтетических генных кластеров (БГК): NPS (Tagirdzhanov et al, 2019), MetaMiner (Cao et al, 2019), CycloNovo (Behsaz et al, 2020). Созданы скрипты для обработки и анализа результатов предсказаний БГК в (мета)геномных сборках: https://github.com/alexeigurevich/rsf-19-16-00049_bgc_analysis. Члены научного коллектива приняли участие в разработке метагеномного сборщика по ONT данным metaFlye (Kolmogorov et al, 2020). Большая часть из разработанного инструментария были применены для обработки данных, полученных в рамках проекта (метагеномные сборки Черневой Тайги, переходной и контрольной почвы).

Анализ полногеномных сборок данных из локаций в Томске и Новосибирске на предмет наличия БГК биологически активных молекул с использованием разработанных подходов и ведущих сторонних инструментов, таких как antiSMASH и BLAST показал, что:

- использование двух библиотек секвенирования (illumina+ONT) существенно улучшает качество сборки и количество собранных БГК, особенно для образцов Черневой Тайги (в 2-10 раз)

- более 80% предсказанных БГК в образцах Черневой Тайги относятся к синтезирующим молекулы четырех классов: нерибосомные пептиды, поликетиды, терпены, рибосомные пептиды с пост-трансляционными модификациями.

- при схожих протоколах секвенирования и обработки данных, для образцов из локаций в Новосибирске, общее число обнаруженных БГК в Черневой Тайге в два раза превышает число БГК в переходной почве и в шесть раз в контроле.

Сверка обнаруженных БГК с базами известных кластеров биологически активных соединений (БАС), химических структур БАС и белковых последовательностей показала, что более чем 85% найденных кластеров являются новыми. При этом обнаружить БГК ответственные за синтез соединений, связанных с эффектом гигантизма растений в Черневой Тайге не получились. Связать предсказанные БГК с их продуктами может использование дополнительных омиксных данных, например, транскриптомных (RNA-seq) или метаболомных (масс-спектры), как показали коллаборативные проекты с учеными Калифорнийского университета в Сан-Диего (Behsaz et al, 2020; Leao et al, 2021).

4. Исследования протозойного компонента почв

В результате исследований протозойного компонента почв черневой тайги показали, что изученные образцы почвы содержат большое количество новых и редких видов голых лобозных амеб, однако в целом обилие и видовое разнообразие протистов в них не является выдающимся. Численность и разнообразие амебоидных протистов, жгутиконосцев и инфузорий в почвах черневой тайги несколько превосходят таковые в переходных и олиготрофных почвах, но это отличие менее чем в два раза. В некоторых случаях численности отдельных групп протистов в контрольных почвах, находящихся вне пределов черневой тайги, оказывались сравнимы. Полученные данные не подтверждают исходную гипотезу, согласно которой в черневой тайге могла наблюдаться повышенная численность трофозоитов при относительно низком видовом разнообразии протистов в почвах черневой тайги, являющемся результатом быстрого оборота органики в изучаемом

экотопе. По всей видимости, аномально высокая продуктивность этой экосистемы и феномен гигантизма растений в ней определяются не только этими факторами. Функционирование протозойного компонента почв черневой тайги, по всей видимости, идет в достаточно обычном режиме, сравнимом с общим средним уровнем для почвы различных типов.

Общая численность голых амёб и других протистов в исследованных почвах и оценка их разнообразия представлена в Таблице 5. В целом получаемые оценки численности голых амёб почвах черневой тайги варьируют от 194 до 256 клеток в одном грамме почвы. Численность жгутиконосцев несколько выше – от 212 до 392 клеток, а инфузорий – от 96 до 142 клеток. Живых раковинных амёб от 2 до 16 клеток. При этом разброс результатов между отдельными повторности достаточно высокий – более чем в два раза, а для отдельных видов – более чем в 10 раз, что четко говорит об агрегированном распределении амёб в почве.

	2020			2021		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
naked lobose amoebae	194	232	212	256	208	130
testate amoebae	10	-	-	16	16	2
heterolobose amoebae	16	16	12	44	24	30
flagellates	212	196	160	392	332	282
ciliates	142	96	134	96	102	48
rotifera	-	2	2	2	10	4
nematoda	6	18	14	4	8	6

Таблица 5. Результаты количественного учета основных групп протистов в выборках 2020 и 2021 годов из Томской области методом МПН (наиболее вероятные числа) (экз. / г почвы естественной влажности).

На морфологическом уровне было идентифицировано 15 видов (Таблица 6) голых амёб, остальных протистов учитывали только с точностью до функциональной группы.

В ход исследований в почвах черневой тайги обнаружили ряд крайне редких или новых для науки видов амёб. Подавляющая часть выделенных изолятов оказались новыми для науки видами. Это наглядно показывает, что общее разнообразие протистов в почвах (в особенности – амёбидных протистов) остается еще крайне слабо изученным. Из наиболее интересных находок отметим первую за более чем 100 лет реизоляцию вида *Thesochaos fibrillosum* – очень крупной, своеобразной и примечательной по внешнему виду лобозной амёбы. Это – первый многоядерный представитель класса *Discosea*, ранее известный только из местообитаний в швейцарии и Франции. Были выполнены светомикроскопические, электронно-микроскопические и молекулярные исследования, включая мультигенную филогению. Установлено положение рода *Thesochaos* в современной молекулярной системе *Amoebozoa*. Результаты этой работы изложены в статье направленной в журнал Q1 (*Organisms Diversity & Evolution*, ISSN 1439-6092) более 4-х месяце назад. К сожалению, рассмотрение статей в этом журнале процесс долгий и на настоящий момент мы не располагаем данными о ее статусе, а потому не приводим ее в списке статей по проекту.

	2020			2021		
	1	2	3	T1	T2	T3
<i>Cochliopodium sp.1</i>	20	78	52	24	22	6
<i>Cochliopodium sp.2</i>	52	58	20	36	78	38
<i>Flamella sp.</i>	48	18	20	18	10	2
<i>Saccamoeba sp.</i>	10	8	6	16	8	10
<i>Hatmannella sp.</i>	-	-	-	2	6	16
<i>Leptomyxa silvatica</i>	16	10	62	102	28	44
<i>Leptomyxa sp.2</i>	6	2	10	20	24	4
<i>Flabellula sp.</i>	-	-	6	4	-	-
<i>Vannella simplex</i>	4	4	10	8	2	2
<i>Vannella sp.</i>	4	2	4	-	-	-
<i>Ripella sp.</i>	18	22	8	2	4	4
<i>Vexillifera sp.</i>	4	20	-	8	8	-
<i>Korotnevela sp.</i>	8	4	-	8	10	-
<i>Mayorella sp.</i>	4	6	8	6	6	4
<i>Thecamoebidae gen.sp.</i>	-	-	-	2	2	6

Таблица 6. Список изолятов голых амёб, выделенных из проанализированных проб почвы, отобранных в 2020 и 2021 годах, со значениями МПН (экз. / г почвы естественной влажности).

Обнаружен и описан новый вид амёб отряда Leptomyxida – достаточно типичных почвенных обитателей, оказавшийся достаточно обильным в изучаемых почвах - до 102 экз. на грамм почвы. Он назван *Leptomyxa silvatica*. В некоторых повторностях этот организм составлял подавляющую часть фауны амёб в почве черневой тайги. Обнаружен организм, по внешнему виду напоминающий представителей рода *Thecamoeba*, но по молекулярным данным

оказавшийся новой длинной ветвью в пределах отряда *Thecamoebida* и несомненно представляющий из себя новый род амёб. Был сделан и еще ряд интересных находок новых видов амёбодных организмов, что подтверждает нашу гипотезу о наличии в почвах черневой тайги большого количества новых и редких видов протистов. Надежных данных о взаимоотношения почвенных амёб с ризосферой растений в литературе практически нет, однако есть некоторые основания полагать, что отдельные виды тяготеют именно к ризосфере растений и потенциально могут быть ответственны за изменения в росте и развитии растений (например, Rosenberg et al. 2009. The ISME Journal, 3: 675–684). Высокие численности отдельных видов амёб и других групп протистов в некоторых образцах могут говорить об их ведущей роли в формировании микробного сообщества ризосферы растений (см. например Asiloglu and Murase 2017. Rhizosphere 4:82-88). Подобные взаимоотношения могут быть одним из компонентов, ответственных за аномальное развитие (в том числе - гигантизм) растений и в изучаемых почвах черневой тайги. Отметим, что в пробах тотальной ДНК из почв черневой тайги были обнаружены ампликоны многих достаточно редких и малоизученных групп протистов – например, криптомикот, которые тоже могут вносить свой вклад в формирование специфических условий, способствующих аномальному росту растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проекта «Метагеномика в оценке экологических функций почв: анализ почвенной микробиоты, связанной с феноменом гигантизма растений черневой тайги Сибири» были выполнены все поставленные задачи, большинство из которых решались впервые. Так, впервые проведены детальные исследования особенностей почв черневых лесов и смежных контрольных регионов, проведен мониторинг влажности почв и определение их влагоемкости, проведено количественное описание гигантизма трав и первые исследования протистов. Впервые проведен филогенетический анализ почвенной микробиоты и характера ее изменения в зависимости от глубины и сезона и микробиоты ризосфер ряда высокорослых растений.

Целью проекта являлось изучение микробиоты уникального региона Западной Сибири и ее участия в феномене высокорослости трав в регионах черневой тайги. При этом очевидно, что высокорослость трав лесной экосистемы не может объясняться одним единственным фактором. На особенности региона влияют климатические условия, характер почвы, режим увлажнения, специфическая флора и ее распространение в регионе, своеобразие состава микробиоты. В черневой тайге практически полностью отсутствует напочвенный моховой покров, а сами почвы показывают исключительно высокий темп разложения растительных остатков и низкое содержание гуминовых кислот.

Для решения задач проекта использовались полевые и лабораторные методы и подходы: различные почвенно-биологические методы, морфологические и молекулярно-генетические и микробиологические подходы, а также применялись современные биоинформатические и статистические подходы и методы анализа метагеномных данных. Впервые проведен комплексный анализ микробиоты почв черневой тайги, включая бактериальный, архейный, грибной и протозойный компоненты. Выполненные в полном объеме исследования являются фундаментом для определения не только состава микробных сообществ черневой тайги и поиска микроорганизмов, обуславливающих высокую производительность данной экосистемы и гигантизм некоторых видов растений, но и совокупности всех факторов, приводящих к феномену высокорослого травостоя в отдельных регионах тайги Западной Сибири.

То, что микробы правят миром, теперь уже хорошо известный факт, но знаем мы о них, несмотря на многолетнюю историю исследований, очень мало. И в первую очередь потому, что только малая их доля (3-5%) может быть изучена в лабораторных условиях. Самым сложным и до сих пор в значительной степени недо-изученным объектом является почвенная микробиота – сообщество микроорганизмов, обитающих в почвах.

Интерпретация данных агрохимического анализа позволила установить, что почвы черневой тайги, отличаются от европейских аналогов из нечерневых лесов развитостью гумусового профиля и повышенным содержанием элементов питания, что способствует формированию особого трофического статуса с выраженным феноменом гигантизма. Также почвы черневой тайги являются более влагоемкими по всем показателям гидрологических констант, что неизбежно сказывается на их плодородии и потенциальной продуктивности, а также на составе микробиоты. Несмотря на то, что мощность подстилок в почвах черневой тайги меньше, чем в почвах олиготрофных лесов, они могут удерживать большее количество влаги, что важно для формирования почвенного климата.

По результатам промеров всех исследованных видов высокорослых трав разница средней максимальной высоты генеративных побегов между двумя местообитаниями оказалась статистически значимой по критерию Стьюдента и составила от 28,5 до 78,5 см. Поскольку в анализ были включены представители трех различных семейств, различия между местообитаниями нельзя трактовать как специфическую реакцию отдельного вида или систематической группы.

Таксономическая структура микробиоты в ризосфере инокулированных компонентами микробиоты почвы черневой тайги растений характерна для микробных сообществ почвы. Доминантными в ризосферной почвенной фракции, отделенной от корней редиса оказались представители Proteobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobiota, Bacteroidota, Actinobacteriota, Acidobacteriota и неклассифицируемых вариантов. Стоит отметить обнаружение нитрифицирующих архей Nitrososphaera и Cand. Nitrosocosmius, которые ранее в ризосфере не обнаруживались. Впервые обнаружены некультивируемые бактерии Cand. Saccharimonadia (Patescibacteria) и Candidatus Udaeobacter. Их влияние на рост растений неизвестно и оно должно стать предметом молекулярного анализа их метаболизма.

Для выяснения причин быстрого исчезновения опада в черневой тайге был проведен ряд лабораторных экспериментов с разложением различных целлюлозосодержащих субстратов и определением таксономического состава микробных сообществ почвы в ходе разложения. Мониторинг скорости разложения субстратов показал, что более высокие темпы разложения характерны для листового опада, чем для соломы, а для Томской почвы темпы разложения выше, чем для Новосибирской.

Лабораторный анализ грибных и прокариотных сообществ, развившихся в процессе разложения целлюлозосодержащих субстратов, позволил зафиксировать субстрат-специфичность данных сообществ, продемонстрировать несколько большую дифференциацию грибных сообществ по сравнению с бактериальными, выявить специфику распределения таксонов в различных субстратах. Для понимания того, как именно выявленная картина объясняет высокую эффективность разложения растительных остатков в почвах черневой тайги, или как можно использовать полученные данные на практике, нужно двигаться в направлении выделения в чистую культуру, целлюлозолитических организмов, но не просто отдельных микроорганизмов, а их ассоциаций (искусственных микробиот), исследования их целлюлозолитического потенциала и перспектив их использования для создания микробных препаратов.

Наиболее перспективными направлениями реализации потенциала микробиоты почв черневой тайги в интересах сельского хозяйства следует считать выделение из ризосферы растений, инокулированных суспензиями почвы черневой тайги (в стерильном вегетационном опыте) штаммов-микроорганизмов в чистые культуры. С использованием полученного списка микроорганизмов-кандидатов на роль рост стимулирующих агентов, а также данных о нуклеотидных последовательностях их генов 16S рРНК следует провести эксперименты, в которых из множества выделенных штаммов отобрать фракцию потенциальных рост стимуляторов и проанализировать их реальные эффекты.

По результатам анализа таксономического состава грибного метагенома почвенных проб в разные сезоны и в разных точках отбора показано, что наиболее распространенными таксонами являются типы Mortierellomycota, Basidiomycota и Ascomycota. Предполагается, что представители Ascomycota преимущественно участвуют

на ранних стадиях разложения листового опада, а затем вытесняются представителями Basidiomycota. Самый многочисленный класс грибов в образцах черневой тайги представлен Mortierellomycetes - сапротрофами, обнаруживаемыми в почве, на гниющих листьях и другом органическом материале. Среди наиболее многочисленных таксонов обнаружены представители филума Glomeromycota - арбускулярных микоризных (АМ) симбиотрофов, которые, как было ранее показано, способны увеличивать количество питательных веществ, доступность воды, обеспечивать гормональную регуляцию и индуцированную микоризой устойчивость растений-хозяев.

Мы считаем, что в уникальных условиях бореальных лесов избыток питательных веществ приводит к гигантскому росту одних растений и нормальному развитию других из-за доступности питательных веществ. Кроме того, нами показано, что колонизация АМ-грибов может приводить к увеличению продукции вторичных метаболитов, что, вероятно, косвенно происходит за счет увеличения поглощения питательных веществ. Таким образом, арбускулярную микоризу (АМ) можно рассматривать как усилитель доступности питательных веществ для растений-хозяев. Из этого можно сделать вывод, что традиционные методы внесения удобрений, основанные на добавлении питательных веществ, могут быть оптимизированы с точки зрения их воздействия на микоризные грибы, тем самым увеличивая богатство и разнообразие грибных сообществ и через них влияя на продуктивность почвы.

Комбинированный подход, включающий описание морфологических характеристик на уровне световой микроскопии и современных молекулярных исследований, подкрепленных сиквенсом фрагментов гена 18S рРНК, позволил выявить новые для науки, ранее не описанные виды простейших. Особый интерес может представлять новый род Thecamoebidae gen.sp - новый род в рамках семейства Thecamoebidae. Также были обнаружены новые виды Flamella sp. 1 и Leptomyxa sp в рамках соответствующих родов, достоверно отличающиеся от ранее описанных видов по морфологическим и молекулярно-филогенетическим данным.

К очень интересным результатам можно отнести обнаружение амебы рода Thecoschaos - крайне редкого рода амеб, последний раз изолированного более 100 лет назад. Подобные находки редких видов говорят о достаточно высоком уровне микробного богатства изучаемых почв.

Современные методы анализа генетической и геномной информации в настоящее время оперируют огромными массивами данных, обработка которых напрямую зависит от программного обеспечения. В связи с этим в рамках проекта решались в том числе задачи создания новых и усовершенствования уже существующих биоинформатических подходов и программ, направленных на всесторонний анализ особенностей уникальных, ранее не описанных, микробиот (микроорганизмов, составляющих то или иное микробное сообщество) и их микробиомов (совокупного генома рассматриваемого сообщества). Все созданные программы выпущены в открытый доступ и опубликованы.

Анализ полногеномных сборок метагеномных данных, проведенный с использованием новых программ, продемонстрировал большое число биосинтетических генных кластеров, ответственных за синтез соединений различных химических классов. Поиск ключевых генов из этих кластеров в крупнейшей общедоступной базе белковых последовательностей NCBI nr показал, что только у 15% из них есть известные близкие аналоги. Сравнительный анализ количества обнаруженных кластеров показал, что в

образцах почвы черневой тайги их в 2 раза больше, чем в образцах переходной почвы и в 6 раз больше, чем в контроле. Кратное различие позволяет выдвинуть гипотезу, что часть из производимых этими кластерами соединений может быть непосредственно связана с феноменом гигантизма в черневой тайге.

Применительно к проекту «Метагеномика в оценке экологических функций почв: анализ почвенной микробиоты, связанной с феноменом гигантизма растений черневой тайги» принцип Анны Карениной может быть сформулирован так: во многих сложных системах лучший способ взглянуть на причины того или иного эффекта - это смотреть на множество необходимых условий, которые должны быть выполнены, а не искать одну единственную прямую причину.

В результате исследований целого ряда факторов, проведённых в рамках междисциплинарного проекта, выявлена следующая закономерность – климатические условия создают благоприятную среду обитания для жизни микроорганизмов, которые в свою очередь, хорошо обеспечивают растения питательными веществами и природной защитой. Эффект обеспечивается скорее всего за счет специфической представленности характерных для почв микроорганизмов с выраженными свойствами стимуляции роста растений и в первую очередь в ризосфере изученных нами растений.

Полученные подтверждения причастности почвенной микробиоты к высокорослости трав и выявление заслуживающих пристального внимания микроорганизмов (бактерий и грибов) позволяют планировать дальнейшие шаги по более детальному изучению механизмов их функционирования и взаимодействия.

Данные о микробиоте и микробиоме экосистемы черневой тайги, полученные в рамках проекта, могут быть включены в крупномасштабные сравнительные исследования генетического разнообразия природных экосистем, т.к. работа выполнена в соответствии с международными протоколами Earth microbiome project (<http://www.earthmicrobiome.org/>).

По результатам проекта опубликовано 14 статей, 8 из которых в наиболее авторитетных журналах, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору баз данных Web of Science и Scopus.

Опубликованные и представленные нами на конференциях результаты проекта привлекли внимание биотехнологов из Москвы и Таллина, и мы рассчитываем, что наши исследования стали реальной практической основой для разработки и применения биоудобрений в системе экологически чистого земледелия, а также при проведении мероприятий по ремедиации и восстановлению нарушенных земель.

Проект также привлек внимание ряда СМИ (например, Российский научный фонд (<https://rscf.ru/news/agriculture/uchyenyevyyasnyatprichinygigantizmarasteniyv-sibirskikh-dzhunglyakh/>); Год науки и технологий 2021 (<https://xn--80afdrjqf7b.xn--plai/news/640/>), Научная Россия (<https://scientificrussia.ru/articles/issledovateli-vyyasnyatprichinygigantizmarastenijv-sibirskih-dzhunglyah> utm_source=yxnews&utm_medium=desktop&utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.com%2Fnews%2Fsearch%3Ftext%3D) и др).

Применение современных метагеномных методов в оценке плодородия почв, подробное исследование генетической информации по структуре и функциональной активности почвенного микробиома, выявление полезных генов почвенных микроорганизмов будет способствовать переходу к высокопродуктивному и экологически чистому агрохозяйству с использованием естественного природного потенциала

экосистемы в дополнение к использованию химических удобрений и средств защиты растений. В конечном итоге, такая смена парадигмы в агропроизводстве будет способствовать созданию безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания.

СПИСОК ОПУБЛИКАЦИЙ

1. Antipov D., Raiko M., Lapidus A., Pevzner P.. Plasmid detection and assembly in genomic and metagenomic data sets //Genome research. – 2019. – Т. 29. – №. 6. – С. 961-968. <https://doi.org/10.1101/gr.241299.118>
2. Bushman TJ., Akob DM., Bohu T., Beyer A., Woyke T., Shapiro N., Lapidus A., Klenk HP., Küsel K. Draft genome sequence of Mn (II)-oxidizing bacterium Oxalobacteraceae sp. Strain AB_14 //Microbiology resource announcements. – 2019. – Т. 8. – №. 43. – С. e01024-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01024-19>
3. Kondratenko Y., Korobeynikov A., Lapidus A. CDSnake: Snakemake pipeline for retrieval of annotated OTUs from paired-end reads using CD-HIT utilities //BMC bioinformatics. – 2020. – Т. 21. – №. 12. – С. 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3122-9>
4. Tagirdzhanov A. M., Shlemov A., Gurevich A. NPS: scoring and evaluating the statistical significance of peptidic natural product–spectrum matches //Bioinformatics. – 2019. – Т. 35. – №. 14. – С. i315-i323. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz374>
5. Cao L., Gurevich A., Alexander KL., Naman CB., Leão T., Glukhov E., Luzzatto-Knaan T., Vargas F., Quinn R., Bouslimani A., Nothias LF., et.al MetaMiner: a scalable peptidogenomics approach for discovery of ribosomal peptide natural products with blind modifications from microbial communities //Cell systems. – 2019. – Т. 9. – №. 6. – С. 600-608. e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.09.004>
6. Abakumov E., Loiko S., Lashchinsky N., Istigechev G., Kulemzina A., Smirnov A., Rayko M., Lapidus, A.. Highly Productive Boreal Ecosystem Chernevaya Taiga-Unique Rainforest in Siberia. – 2020. <https://doi.org/10.20944/preprints202009.0340.v1>
7. Абакумов Е.В., Лойко С.В., Истигечев Г.И., Кулемзина А.И., Лашинский Н.Н., Андронов Е.Е., Липидус А.Л. Почвы черневой тайги Западной Сибири - морфология, агрохимические особенности, микробиота //Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – №. 5. – С. 1018-1039. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.5.1018rus>
8. Kolmogorov M., Bickhart D.M., Behsaz B., Gurevich A., Rayko M., Shin S.B., Kuhn K., Yuan J., Polevikov E., Smith T., Pevzner P. metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs //Nature Methods. – 2020. – Т. 17. – №. 11. – С. 1103-1110. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00971-x>
9. Abakumov E., Loyko S., Istigechev G., Lapidus A. Physical properties as a key factor in the soil functioning in Chernevaya Taiga (Western Siberia) //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – Т. 862. – №. 1. – С. 012036. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/862/1/012036>
10. Leão, T., Wang, M., Moss, N., da Silva, R., Sanders, J., Nurk, S., Gurevich A. et al. A Multi-Omics Characterization of the Natural Product Potential of Tropical Filamentous Marine Cyanobacteria //Marine drugs. – 2021. – Т. 19. – №. 1. – С. 20. <https://doi.org/10.3390/md19010020>
11. Polyakov V, Loiko S, Istigechev G, Lapidus A, Abakumov E. Elemental and molecular composition of humic acids isolated from soils of tallgrass temperate rainforests (Chernevaya

taiga) by ^1H - ^{13}C HECTCOR NMR spectroscopy //Agronomy. – 2021. – T. 11. – №. 10. – C. 1998. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101998>

12. Rayko M., Sokornova S., Lapidus A. Fungal metagenome of Chernevaya Taiga soils: taxonomic composition, differential abundance and factors related to plant gigantism //Journal of Fungi. – 2021. – T. 7. – №. 11. – C. 908. <https://doi.org/10.3390/jof7110908>