Е.В. Благодатская
М.В. Семенов
А.В. Якушев

АКТИВНОСТЬ И БИОМАССА ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В ИЗМЕНЯЮЩИХСЯ УСЛОВИЯХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

УДК 579.26:631.46
ББК 28.4+40.3
Б68
Благодатская Е.В., Семенов М.В., Якушев А.В. Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. – М.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. - 243 с.

В монографии изложены 1) концепция активной микробной биомассы как ключевого звена, определяющего величины запасов и скорости потоков углерода в почве, и 2) концепция доминирующей экологической стратегии роста почвенного микробного сообщества. Определена роль разных пулов микробной биомассы в биотической трансформации органического вещества почвы. Обсуждается применимость традиционных и современных методов для определения биомассы активных микроорганизмов в почве. Отдельная глава посвящена археям — относительно новому объекту в исследовании микробных популяций почв, их систематике и экологическим преимуществам по отношению к бактериям в условиях экстремального воздействия факторов окружающей среды. Центральное место в книге отведено анализу стратегий роста почвенных микроорганизмов в зависимости от эколого-трофических условий. Выделены доминирующие стратегии роста микроорганизмов в зависимости от качества и количества субстрата, растительности и типа землепользования. Определено влияние на ростовую стратегию микроорганизмов таких стрессовых экологических факторов как повышенное содержание углекислого газа, загрязнение тяжелыми металлами, а также дефицит влаги и воздействие высоких температур. Последняя глава посвящена кинетическим параметрам роста микроорганизмов в палеопочвах, которые рассматриваются в качестве модельных объектов преимущественного развития олиготрофных микробных сообществ.
Книга рассчитана на широкий круг ученых и специалистов в области почвоведения, экологии и микробиологии, других смежных биологических и сельскохозяйственных дисциплин, будет полезна преподавателям вузов, аспирантам и студентам в качестве учебного пособия.

Ответственный редактор: член-корр. РАН *В.Н. Кудеяров*

Рецензенты:
А.Л. Степанов, доктор биологических наук, профессор
О.В. Меняйло, доктор биологических наук, профессор РАН

Монография рекомендована к печати учёным советом ИФХиБПП РАН

© Е.В. Благодатская, М.В. Семенов, А.В. Якушев, текст, иллюстрации, 2016
© ИФХиБПП РАН, 2016
© Почвенный институт имени В.В. Докучаева, 2016
© МГУ имени М.В. Ломоносова, 2016
© Товарищество научных изданий КМК, 2016

ISBN 978-5-9908165-6-5

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОМАССЕ И АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ 8
1.1. Пулы микробной биомассы почв: общая, активная, покоящаяся, мертвая 8
1.2. Методы определения микробной биомассы и активности почвенных микроорганизмов 11

2. АРХЕИ — НОВЫЙ ОБЪЕКТ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПОЧВ 35
2.1. Экологические преимущества архей по отношению к бактериям в условиях хронического энергетического стресса 35
2.2. Систематика почвенных архей 39
2.3. Специфические функции архей и бактерий в глобальных циклах углерода и азота 47

3. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВЕ 60
3.1. Конкуренция микроорганизмов с разными стратегиями роста 60
3.2. Проблемы и способы определения стратегий роста почвенных микроорганизмов 62

4. МЕХАНИЗМЫ ПРАЙМИНГ-ЭФФЕКТА И ЕГО ЗАВИСИМОСТЬ ОТ АКТИВНОЙ БИОМАССЫ И СТРАТЕГИИ РОСТА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОЧВЫ 65
4.1. Современные представления о прайминг-эффекте в почве 65
4.2. Зависимость прайминг-эффекта от количества добавленного субстрата и от величины микробной биомассы 67
4.3. Зависимость прайминг-эффекта от качества субстрата и физико-химических свойств почв 72
4.4. Сукцессия механизмов и стратегии роста микроорганизмов в ходе прайминг-эффекта 76

5. ДОМИНИРУЮЩИЕ СТРАТЕГИИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КАЧЕСТВА И КОЛИЧЕСТВА СУБСТРАТА..... 80
5.1. Рост микроорганизмов на субстратах различной доступности 80
5.2. Кинетические характеристики роста микроорганизмов в зависимости от количества доступного субстрата 83

6. ВЛИЯНИЕ РАСТЕНИЙ И РАЗНЫХ СИСТЕМ ЗЕМЛЕПОЛЬЗОВАНИЯ НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ..... 94
6.1. Влияние растений на экологические стратегии микробных сообществ почв..... 94
6.2. Влияние длительного применения разных систем удобрений на кинетические параметры роста почвенных микроорганизмов 105
6.3. Кинетика роста микроорганизмов при разном сельскохозяйственном использовании 115

7. АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ РОСТОВЫХ СТРАТЕГИЙ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ 126
7.1. Характеристики роста микробного сообщества почвы и ризосферы в условиях повышенной концентрации CO_2 в атмосфере 126
7.2. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на ростовые характеристики микроорганизмов почвы и ризосферы..... 137
7.3. Влияние свинца на дыхание и биомассу почвенных микроорганизмов 149
7.4. Ростовые характеристики микроорганизмов в почвах техногенно-загрязненных территорий 159
7.5. Влияние высушивания и термической обработки на доминирующую экологическую стратегию микробного сообщества почвы 172

8. КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В ПАЛЕОПОЧВАХ..... 194
8.1. Проблемы исследования микробиологической активности палеопочв 194
8.2. Содержание микробной ДНК в палеопочвах..... 196
8.3. Кинетические показатели роста микроорганизмов в палеопочвах 197

ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 204

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 205

Глава 1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОМАССЕ И АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1. Пулы микробной биомассы почв: общая, активная, покоящаяся, мертвая

Большинство биохимических процессов в почве осуществляется микроорганизмами, поэтому вопросы, связанные с исследованием микробной биомассы, являются центральными не только в почвоведении, но и во всех смежных с биогеохимией дисциплинах. Микробная биомасса рассматривается в таких исследованиях в качестве движущей силы биогеохимических циклов (Добровольская и др., 2015). В этой связи необходимо знать, какие микроорганизмы несут ответственность за конкретные процессы и, в более общем смысле, какая часть микробной биомассы осуществляет круговорот элементов.

Микробные популяции в почве представлены очень широким спектром микроорганизмов, находящихся в четырех физиологических состояниях. Первые три — жизнеспособные состояния. Во-первых, это активное состояние микроорганизмов. **Активные** микроорганизмы непосредственно участвуют в трансформации органических соединений и в связанных с ними биохимических превращениях. Во-вторых, это **потенциально активные** микроорганизмы. Эта фракция пребывает в состоянии ожидания и может переключиться на использование поступившего субстрата в сравнительно короткие сроки от нескольких минут до нескольких часов. Следующее состояние жизнеспособных микроорганизмов является состоянием покоя (**покоящиеся** формы). Микроорганизмы в таком состоянии не участвуют непосредственно в процессах трансформации органического вещества почвы, но могут внести свой вклад в условиях, способствующих их переходу в активное состояние. Наконец, четвертое состояние микроорганизмов в почве — **мертвые**, но количественно определяемые с помощью некоторых методов. Мертвая биомасса (или некромасса) не оказывает прямого воздействия на текущие биогеохимические процессы, однако может служить в качестве доступного субстрата, тем самым влияя на разложение органического вещества почвы. Все эти состояния общей микробной биомассы вносят вклад в функционирование почвенных экосистем, и этот вклад различается в зависимости от условий окружающей среды и практики землепользования. Тем не менее, кинетика процессов трансформации органического вещества определяется активной (а не общей) микробной биомассой, которая является основной движущей силой биогеохимического круговорота элементов в почве.

Большинство методов оценки микробной биомассы (согласно обзорам Beck et al., 1997; Nannipieri et al., 2003; Hartmann et al., 2004; Bölter et al., 2006; Joergensen, Emmerling, 2006; Joergensen, Wichern, 2008) были разработаны для измерения общей микробной биомассы. Однако, поскольку большинство процессов обусловлены активными микроорганизмами, для оценки участия микроорганизмов в функциях экосистем необходимо количественно разделять биомассу активных и покоящихся микроорганизмов (Ellis et al., 2003). Это создало предпосылки для разработки концепции **активной микробной биомассы почвы**. В настоящей главе после определения терминов, мы оценили применимость существующих методов для оценки активной части микробной биомассы и затем сравнили подходы по их пригодности для оценки трех разновидностей жизнеспособной микробной биомассы. Кроме того, мы предложили пороговые значения или диапазоны параметров в качестве критериев для дифференциации трех разновидностей жизнеспособной микробной биомассы при помощи различных подходов.

Целью данного анализа не являлось описание активности микроорганизмов как таковой, т.е. микробного дыхания, скорости разложения некоторых природных субстратов и ксенобиотиков, трансформации биогенных элементов, АТФ, или ферментативной активности. Тем не менее, мы обращаемся к некоторым из этих подходов, если они прямо или косвенно позволяют оценить и охарактеризовать часть активных микроорганизмов в почве.

Общая микробная биомасса включает в себя все живые почвенные организмы меньше 150–200 мкм (Swift et al., 1979; Coleman, Wall, 2007). Общее количество микробной биомассы является относительно небольшим (50–2000 мкг С $г^{-1}$ почвы) и, как правило, не превышает 3% от содержания органического углерода (Anderson, Domsch, 1980). **Мертвые** микроорганизмы находятся в необратимом состоянии, в котором не наблюдается рост, удлинение клеток или синтез белка (Villarino et al., 2000). Мертвая биомасса, или микробная некромасса, выступает в качестве дополнительного пула доступного субстрата, но не может активно участвовать в биохимических процессах. Однако долю некромассы необходимо учитывать при определении активных микроорганизмов, основанном на извлечении/окрашивании клеточных компонентов, сохраняющихся как в живых, так и мертвых микробных клетках. Кроме того, необходимо учитывать **пул внеклеточных ферментов**, как «часть» неживой микробной биомассы, которая все еще «активна» и может осуществлять процессы гидролиза / окисления субстратов долгое время после гибели микроорганизмов.

Лишь незначительная часть общей микробной биомассы поддерживает активное состояние в почве без внесения легкодоступных субстратов, в то время как большая часть живых клеток неактивна (Jenkinson, Ladd, 1981; Prosser et al., 2007). Мы предлагаем определение **активной микробной биомассы** как *части общей микробной биомассы, которая 1) непосредствен-*

но использует доступные в почве субстраты или 2) способна немедленно реагировать на внесение субстрата, например, вырабатывать ферменты и использовать субстрат без лаг-фазы, и 3) способна расти и воспроизводиться при наличии субстрата.

Переход в состояние покоя — распространенная стратегия в природе, используемая различными организмами для преодоления неблагоприятных условий окружающей среды (Dworkin, Shah, 2010; Jones, Lennon, 2010; Lennon, Jones, 2011). В этом состоянии почвенные микроорганизмы практически не оказывают влияния на глобальные биогеохимические процессы, например, такие, как выделение CO_2 из почвы. Микроорганизмы используют разные способы формирования покоящихся структур, например, образование спор арбускулярно-микоризными грибами *Scutellospora castanea* или цист с утолщением клеточных стенок в филаментах цианобактерий *Cylindrospermum* sp., а также эндоспор бациллами *Viridibacillus arvi* (Roszak, Colwell, 1987; Jones, Lennon, 2010). При этом во всех случаях переход в покоящееся состояние характеризуется резким снижением физиологической активности клеток (Lennon, Jones, 2011). Не все почвенные микроорганизмы обладают способностью образовывать споры, например, это характерно для Грам-положительных бактерий, в то время как Грам-отрицательные в условиях голодания способны переходить в некультивируемое состояние, часто сопровождающееся уменьшением размеров клеток до наноформ (Panikov, 2005). Кроме того, многие бактерии могут поддерживать жизнеспособность, используя энергетические ресурсы с очень медленной скоростью в течение длительного времени за счет снижения метаболической активности (Raubuch et al., 2002). Споры грибов формируются в основном для репродукции, но также позволяют сохранить жизнеспособность при неблагоприятных условиях. Таким образом, различные формы состояния покоя микроорганизмов характеризуются сильно сниженной дыхательной активностью и замедлением эндогенного метаболизма течение длительного периода времени. В связи с этим микроорганизмы в состоянии покоя не оказывают существенного влияния на круговорот биогенных элементов. Скорость микробного отклика на внесение субстрата или на изменение условий окружающей среды позволяет распознавать покоящееся и активное состояние микроорганизмов (табл. 1).

Однако, отдельные покоящиеся клетки (в том числе некультивируемые) способны увеличивать метаболическую активность (например, дыхание) в течение нескольких минут в ответ на внесение субстрата, даже если деление клеток начинается несколькими часами или несколькими днями позже (Winding et al., 1994; Konopka et al., 2011). Микроорганизмы быстро переходящие из неактивного состояния в активное, являются потенциально активными — существующими между активным и неактивным физиологическим состояниями. В эту группу входят голодающие клетки, покоящиеся формы и споры, быстро (за 3–24 ч) переходящие из покоя в активное состояние (Placella et al., 2012).

Таблица 1.

Физиологическое состояние микроорганизмов в почве.

Показатель	активные	потенциально активные	покоящиеся	мертвые
Отклик на внесение пищи	немедленно	через несколько часов	более 10–12 ч	нет
Лаг-период	отсутствует	4–12 ч	12–36 ч	–
Скорость и фаза роста	Экспоненциальный 0,1–0,35 $ч^{-1}$	Стационарный 0,003–0,03 $ч^{-1}$	Стационарная 0 $ч^{-1}$	–
Соотношение РНК:ДНК	1,5–2	0,5–1,5	>0,5	различно
Содержание АТФ	>2 мкг $г^{-1}$ п >12–15 мкмол $г^{-1}$ $С_{микр}$	–	<1 – 2 мкг $г^{-1}$ п >5 – 10 мкмол $г^{-1}$ $С_{микр}$	–
Соотношение форм аденилата	>0,75	–	<0,75	–
Увеличение PLFA	>40%	–	<40%	–
Соотношение фонового дыхания и СИД	>0,3	0,1–0,3	<0,1	–

1.2. Методы определения микробной биомассы и активности почвенных микроорганизмов

В обзорах Breeuwer и Abee (2000), Nannipieri et al. (2003), Hartmann et al. (2004), Bölter et al. (2006), Joergensen и Emmerling (2006), Joergensen и Wichern (2008), Musat et al. (2012) подробно описаны методы оценки микробной биомассы, их преимущества и недостатки. В настоящей работе мы оцениваем возможности методов, позволяющих различить физиологические состояния почвенных микроорганизмов. Для оценки активной фракции микробной биомассы используется ряд косвенных критериев: культивируемость или окрашивание определенными красителями, количество биомаркеров в микробных клетках и интенсивность метаболической / дыхательной активности. Рассмотрим ограничения этих косвенных подходов, которые следует учитывать для интерпретации результатов.

Подсчёт колоний и микробные культуры

Несмотря на то, что количество вырастающих на плотных средах колоний около 1% от общего числа микроорганизмов почвы, количество колониеобразующих единиц (КОЕ) положительно коррелирует с ферментативной и дыхательной активностью (Sanchez-Peinado et al., 2009). Поэтому подсчет колоний

до сих пор применяется для характеристики относительного содержания активных и потенциально активных физиологических групп микроорганизмов с определенными функциями или трофическими потребностями (Neble et al., 2007). Тем не менее, не все активные микроорганизмы можно исследовать подобным методом, поскольку способность к размножению не обязательно связана с метаболической активностью: голодающие микроорганизмы могут оставаться метаболически активными (Maraha et al., 2004) и разлагать органические субстраты в почве (Forlani et al., 1999; Mijangos et al., 2009), хотя они и не растут на агаре. С другой стороны, некоторые бактериальные и грибные споры неактивны в почве, но культивируемы и также учитываются при подсчете КОЕ и отражают потенциально активную биомассу.

Таксономический состав активного бактериального сообщества может быть представлен на 30–40% (Bernard et al., 2007) или даже на 80% (Roszak, Colwell, 1987) некультивируемыми микроорганизмами: активная микробная биомасса, следовательно, сильно недооценивается при использовании метода подсчета колоний. Таким образом, посев в жидких культурах (Chin et al., 1999) или на твердых средах (Constant et al., 2008, 2010) используется в настоящее время для мониторинга потенциальной активности, морфологии и физиологических характеристик микробных групп, выполняющих определенные функции в почве (например, разложение клетчатки, метаногенез или окисление водорода) в почве (Dunfield, Conrad, 2000).

Несмотря на данные недостатки, динамика колониеобразования была использована для расчета для расчета скоростей роста культивируемых микроорганизмов при помощи кинетического подхода, основанного на динамике образования колоний (Hashimoto, Hattori, 1989; Якушев, 2015). Время появление видимой колонии зависит от 1) периода, предшествующего росту микроорганизмов, то есть лаг-периода, 2) размера микробной клетки — при одинаковом времени удвоения визуализация колонии крупных клеток происходит раньше и за меньшее количество делений по сравнению с мелкими клетками, и 3) темпов микробного роста как такового. Таким образом, кривые колониеобразования выявляют, какие колонии / группы микроорганизмов начинают расти первыми. Поскольку деление клеток начинается гораздо раньше, чем колония может быть обнаружена, подсчёт колоний оценивает сумму активных и потенциально активных микроорганизмов без дифференциации активной микробной фракции. Анализ времени образования колоний показал, что быстрорастущие формы были представлены в основном копиотрофами, грам-положительными и спорообразующими бактериями (Kasahara, Hattori, 1991). Потенциально активные культивируемые бактерии имели большие размеры клеток (4–7 мкм), но их количество оказалось в 2,5–5 раз меньше, чем количество медленно растущих или покоящихся бактерий, среди которых преобладали грам-отрицательные и олиготрофы (табл. 2).

Таблица 2.

Относительный вклад (% от общей биомассы) потенциально активных (ПА), активных (А), покоящихся (П) и мертвых (М) микроорганизмов в общую микробную биомассу (МБ) в почвах и осадках, определенный методами культивирования на средах и прямой микроскопией.

Метод/ краситель	***Объектt***	***ПА***	***А***	***П***	***М***	***Источник***
	Неактивированные почвы					
Акридиновый оранжевый (АО, общая МБ), СТС (активная МБ), формирование микроколоний	Почва под ячменем	4–11	2–6	83–94		Winding et al., 1994
СТС (активная МБ), Йодистый пропидий (PI) (мертвая МБ)	Микробный инокулят; лаг-	5	<1	90	4	Maraha et al., 2004
СТС (активная МБ), PI (мертвая МБ)	Микробный инокулят, голодание	–	<1	23	77	Maraha et al., 2004
Специфические ингибиторы + окрашивание: SYBR green, PI и AO	Морские осадки	6–11	0,3–4	26–30	70–74	Luna et al., 2002
Частота клеточных делений	Почва 0–10 см 10–25 см	–	3,43 3,42	–	–	Bloem et al., 1992a
Авторадиография	Почва, грибы	–	0,8–0,9	–	–	Bååth, 1987
Средние значения для неактивированных почв		**7,4%**	**1,9%**	**42%**	**56%**	
	Почвы, активированные растительными остатками или глюкозой					
Грибы: calcofluor-FB28 (общая МБ), FDA (активная МБ)	Нативная почва *		2,5–14	86		Busse et al., 2009
	Минеральная фракция*		10–26	74–90		Busse et al., 2009
	Органическая фракция*		3-6	94–97		Busse et al., 2009
СТС (активная МБ), PI (мертвая МБ)	Микробный инокулят, активация	30	4–87	58–73	25–54	Maraha et al., 2004
Авторадиография	Нативная почва бактерии**		56–72			Ramsay, 1983
Частота клеточных делений	Нативная почва опт. влажность высушивание-увлажнение		10 16–23			Bloem et al., 1992b

Таблица 2. (*окончание*)

Метод/ краситель	***Объект***	***ПА***	***А***	***П***	***М***	***Источник***
Средние значения для активированных почв		**30%**	**25%**	**66%**	**40%**	
Неактивированные почвы без разделения на А и ПА						
динамика образования колоний	Луговая почва	16		84		Kasahara, Hattori, 1991
динамика образования колоний	Почва рисовых чеков	30		70		Hashimoto, Hattori, 1989
Комбинация FISH с DAPI	Нативная почва	5–10		90		Christensen et al., 1999
Комбинация FISH с DAPI	Бактерии, изолят из почвы	58		42		Caracciolo et al., 2005
Комбинация FISH с DAPI	Бактерии, изолят из почвы	55		45		Betraux et al., 2007
Комбинация FISH с DAPI	Нативная почва	41–47		53–59		Zarda et al., 1997
Прямая микроскопия с INT	Нативная почва бактерии грибы	49 52 48		51 48 52		Norton, Firestone, 1991
Прямая микроскопия с INT	Ризосфера бактерии грибы	55 68 51		45 72 49		Norton, Firestone, 1991
Прямая микроскопия с CTC (активная МБ) и DTAF (общая МБ)	Нативная почва 1,9 m 2,3 m	 10–40 10–30				Bhupathiraju et al., 1999
Прямая микроскопия с CTC (активная МБ) и DTAF (общая МБ)	Техногенное загрязнение 1,9 m 2,3 m	 45–65 39–66				Bhupathiraju et al., 1999
Средние значения для неактивированных почв		**40%**		**56%**		

* лесная подстилка

** глюкоза

Прямая микроскопия в сочетании с окрашиванием клеток

Общую и активную биомассу различают при флуоресцентной микроскопии по окрашиванию специфическими красителями. Красители, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами (акридиновый оранжевый; SYBR Green; 4,6-диамидино-2-фенилиндол [DAPI]), белками (флуоресцеин изотиоцианат — [FITC]) или полисахаридами клеточных стенок (феноланилиновый синий; фенолтриптофановый синий; 5-4,6- дихлортриазин аминофлуоресцеин — [DTAF]) проникают сквозь клеточные мембраны. Эти красители окрашивают клетки в активном, покоящемся и мертвом состоянии. Другие красители, связы-

вающиеся с нуклеиновыми кислотами (йодистый пропидий и бромистый этидий) не проникают сквозь мембраны и не окрашивают живые клетки. Эти красители, как правило, используются для идентификации мертвых клеток с нарушенной мембраной (Busse et al., 2009; Luna et al., 2002). Мертвые, но неповрежденные клетки, однако, не обязательно окрашиваются йодистым пропидием (Maraha et al., 2004; Busse et al., 2009), что может привести к неверной интерпретации неокрашенных клеток как покоящихся. Осторожность в интерпретации также необходима, если активные клетки непосредственно не окрашиваются. Так, применение двойного окрашивания (например, с DAPI и PI) для оценки активной биомассы путем вычитания мертвых клеток (PI) из общей популяции бактерий (DAPI) может привести к заблуждению, так как покоящиеся микроорганизмы также окрашиваются DAPI. Недоучет покоящихся клеток приводит к завышению активной биомассы. Так, неправдоподобно высокая доля активной бактериальной биомассы, составившая большую часть общей популяции бактерий (табл. 1), была обнаружена при вычитании клеток, окрашенных PI, из общего количества бактериальных клеток, окрашенных красителем SYBR Green (Busse et al., 2009). Это произошло из-за игнорирования пула покоящихся микроорганизмов. В том же исследовании, прямое окрашивание активной и общей биомассы грибов (диацетатфлуоресцином [FDA] и калькофлуор-FB28 соответственно) выявило относительно небольшую биомассу активных грибных гиф (1,5–10% от общей биомассы грибов), что не подтверждает гиперактивное состояние микробного сообщества в целом. Для правильной интерпретации результатов окрашивания необходимо применение дополнительных красителей, позволяющих оценить пул покоящихся бактериальных популяций путем вычитания активных и мертвых клеток из общего количества бактерий.

Жизнеспособные микробные клетки непосредственно окрашиваются красителями FDA, 5-циано-2, 3-дитолил-тетразолия хлорид (CTC) или 2 - (p-иодфенил) -3 - (p-нитрофенил) -5 - фенил тетразолия хлорид [INT] (Nannipieri et al., 2003; Maraha et al., 2004). Флюоресценция, регистрируемая после применения таких красителей, является результатом метаболической активности клеток, например, после преобразования нефлуоресцентного FDA живыми клетками в зеленый флуоресцирующий компонент или после восстановления CTC или INT активно дышащими бактериями до красного флуоресцентного формазана.

Продуктивным оказывается сочетание прямой микроскопии с другими подходами. Например, определение активных микроорганизмов по частоте деления клеток возможно при микроскопировании непосредственно того же препарата, который используется для общего подсчета бактерий. Метод не требует длительной инкубации и применим как для оценки активно растущей доли микробной биомассы, так и в качестве показателя бактериального роста в почве *in situ* (Bloem et al., 1992a, b).

Дифференциацию физиологического состояния выделенных культур можно проводить с помощью прямой микроскопии после внесения в почву

дрожжевого экстракта (в качестве ростового субстрата) и налидиксовой кислоты (ингибитор репликации ДНК). При этом активные / откликающиеся на внесение субстрата и чувствительные к антибиотику клетки увеличиваются в объеме, в то время как покоящиеся или мертвые клетки не реагируют на антибиотик и не меняются в размерах (Zelibor et al., 1987; Villarino et al., 2000; Mascher et al., 2003; Troxler et al., 2012).

Сочетание прямой микроскопии и авторадиографии после добавления радиоактивного субстрата (например, ^{3}H- или ^{14}C-глюкозы, $^{14}CH_4$) позволяет обнаружить метаболически активные бактерии (Ramsay, 1983), грибы (Baath, 1988), или функциональные группы микроорганизмов, например, метанотрофов (Schtill-Braun et al., 2011). Менее 1% грибов продемонстрировали метаболическую активность после добавления следовых количеств ^{14}C-глюкозы (табл. 1), в то время как доля реагирующих на FDA грибов была в 2–4 раза выше (Baath, 1988). В противоположность этому более 70% бактерий оказались метаболически активными после внесения ^{3}H-глюкозы (Ramsay, 1983).

Окрашивание экстрагированных из почвы микробных клеток при помощи CTC и INT выявило неожиданно большой процент функционально активных клеток как в ризосфере, так и в неризосферной почве (табл. 2). Поскольку процедура окрашивания CTC / INT занимает 4 ч, потенциально активные микроорганизмы могут также вносить вклад в микробную фракцию, определяемую по активному электронному транспорту. Процент CTC / INT-положительных бактерий (от их общего числа) варьировал в различных образцах почвы от 10 до 49%, тогда как в почвах с высокой микробной активностью (например, в ризосфере или при загрязнении углеводородами), содержание потенциально активных микроорганизмов составило до 39–66% (Bhupathiraju et al., 1999; Norton, Firestone, 1991). При одинаковом вкладе INT-активных грибов в общую биомассу содержание активных бактерий оказалось на 30% выше в ризосфере, чем в неризосферной почве (Norton, Firestone, 1991). Доля активных бактерий, определяемая по частоте деления клеток, составила менее 3,5% от общей бактериальной биомассы и увеличилась до 10 и 23%, соответственно, при оптимальной влажности или в условиях высушивания-увлажнения (Bloem et al., 1992б).

Применение прямой микроскопии бактериальных культур (Maraha et al., 2004) или микроскопии в сочетании со специфическим ингибированием (Luna et al., 2002) показали, что при добавлении легко доступных субстратов в почву доля активных микроорганизмов увеличивалась до 11–25% от общей микробной биомассы, в то время как в условиях голодания доля активных микроорганизмов снижалась до 1–5% (табл. 2). Это свидетельствует о прекращении метаболизма и изменении физиологического состояния большей части активно растущих культивируемых клеток при голодании.

К недостаткам прямой микроскопии можно отнести вероятность учета почвенных частиц за микроорганизмы и условность выбора коэффициен-

тов пересчета числа клеток на биомассу (Мирчинк, Паников, 1985; Domsch et al., 1979). Методу прямой микроскопии свойственно также преувеличение численности и биомассы грибов в почве. Наконец, 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).

Попытки оценить метаболические функции и размеры клеток активной фракции микробного сообщества почвы на основе сочетания прямой микроскопии с применением специфических красителей (Norton, Firestone, 1991), проточной цитометрии (Maraha et al., 2004), определения содержания рибосом (Christensen et al., 1999), метода FISH (см. ниже), выделения компонентов, характеризующих жизнеспособность клетки (АТФ, PLFA, РНК; — см. ниже), с метаболическими показателями (дыхание, ферментативная активность — см. ниже) показали, что снижение активной микробной биомассы не всегда приводит к снижению числа активных клеток. Уменьшение размеров активных клеток до <0,5 мкм в диаметре (Christensen et al., 1999), сопровождавшееся увеличением гетерогенности популяции (Maraha et al., 2004), иллюстрирует способность микроорганизмов изменять морфологию клеток, но сохранять активное состояние при нехватке питательного субстрата. Кроме того, размеры активных клеток в жидкой культуре (объем > 0,18 мкм^3) (Christensen et al., 1995); >0,3 мкм^3 (Norton, Firestone, 1991) могут сильно отличаться от размеров клеток *in situ* из-за высокой доли клеток бактерий и архей сверхмалого размера, составляющих до 75% от общей популяции клеток в почве (Panikov, 2005). Небольшой размер в почве указывает либо на голодание клеток, приводящее к снижению метаболической активности и замедлению роста и обратимому измельчанию (De Fede, Sexstone, 2001), или о наличии сверхмалых форм бактерии, способных быстро расти (время генерации около 6 ч.) (Iizuka et al., 1998), сохраняя при этом небольшой размер (Rutz, Kieft, 2004). Сверхмалые клетки, составлявшие 15% сообщества, представляли лишь 0,1% от общего пула ДНК почвы, и только 2% от общего дыхания (Panikov, 2005). Таким образом, необходимо учитывать физиологические особенности наноформ для оценки их вклада в активность микробной биомассы почвы.

Физиологические методы

Метод СИД основан на измерении начальной скорости дыхания активных и потенциально активных микроорганизмов после обогащения почвы дополнительным источником углерода в виде глюкозы (Anderson, Domsch, 1978). Однако поскольку для калибровки метода использовался метод фумигации-экстракции, то СИД даёт информацию о всей микробной биомассе путём пересчета скорости субстрат-индуцированного дыхания по формуле. Ком-

бинация СИД с внесением в почву антибиотиков для селективного подавления активности бактерий и грибов позволяет разделять грибной и бактериальный компонент в микробной биомассе(Семенов и др., 2013).

Метод фумигации-экстракции (ФЭ) — второй по распространенности после метода субстрат-индуцированного дыхания (СИД) способ измерения общего углерода микробной биомассы (Brookes et al., 1985; Vance et al., 1987). По методу ФЭ 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 $C_{орг}$ умножается на пересчетный коэффициент *K*c, устанавливаемый эмпирическим путем (Brookes et al., 1985). Существенным недостатком метода невозможность разделить физиологические группы микробной биомассы.

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 $C\text{-}CO_2$. 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 $C_{мб}$ используется пересчетный коэффициент *K*c=0,41 (*K*c — фракция углерода микробной биомассы, минерализованной до $C\text{-}CO_2$ в течение 10 дней).

Методы СИД, ФИ и ФЭ, считающиеся стандартными, в действительности имеют много ограничений, давая порой несопоставимые величины содержания микробной биомассы в почве. 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 pH 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 (Sparling, West, 1990; Oren, Steinberger, 2008), 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 pH 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).

Молекулярные методы и содержание клеточных компонентов

Содержание ДНК и РНК

Одним из преимуществ в определении общей микробной биомассы на основе количественного определения ДНК 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.

Активное состояние микроорганизмов может быть выявлено 1) на уровне репликации ДНК — по увеличению содержания ДНК при росте клеток и 2) на уровне экспрессии генов — по увеличению содержания РНК в процессе синтеза белка. При переходе в активное состояние содержание ДНК может увеличиваться одновременно с интенсификацией микробного дыхания, связанной с началом ростовых процессов (Marstorp, Witter, 1999), или несколькими часами позже (Благодатская и др., 2003). Однако, во время обратного перехода от активного роста к голоданию, высокое содержание ДНК может сохраняться в течение недели после замедления микробного дыхания (Anderson, Martens, 2013). Поэтому замедление метаболизма при переходе из активного в потенциально активное состояние не сопровождается немедленным снижением количества ДНК. Таким образом, динамика содержания ДНК отражает изменения в микробной биомассе в процессе роста, однако по содержанию ДНК не удается отличить активное состояние микробного сообщества от потенциально активного.

На уровне экспрессии генов, выявление активного состояния микроорганизмов за счет увеличения содержания мРНК во время транскрипции, или высокого уровня содержания рРНК в процессе трансляции затруднено из-за быстрой деградации РНК в процессе её выделения из почвы (Musat et al., 2012). Именно поэтому методы, которые не требуют выделения нуклеиновых кислот, такие как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), более предпочтительны для определения активных микроорганизмов в микробном сообществе. Метод FISH основан на гибридизации флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зондов с комплементарными последовательностями 16S и 18S рРНК в прокариотических или эукариотических клетках соответственно. Сочетание FISH с окрашиванием общей микробной биомассы красителями, имеющими высокое сродство к ДНК (DAPI или акридиновый оранжевый), облегчает определение доли активных микроорганизмов.

Метод FISH 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, Tippkotter, 2008; Schmidt, Eickhorst, 2014). Данный метод позволяет количественно определять живые метаболически активные клетки почвенного микробного сообщества (Манучарова, 2008; Манучарова и др., 2011; Семенов, Манучарова, 2015) 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 про-

граммного 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) микроскопирование. Для гибридизации используют набор рРНК-специфичных олигонуклеотидных проб длиной в 15–30 нуклеотидов, ковалентно связанных 5′-концом с флюоресцирующей молекулой. Стандартными флуорофорами служат флуоресцин, тетраметилродамин, 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 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 (Kubota et al., 2006, 2008; Nakamura et al., 2006; Schmidt, Eickhorst, 2014) и метанотрофов (Dedysh et al., 2001; Schmidt, Eickhorst, 2014), определять 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 микропедологических 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 микрозонах (Eickhorst, Tippkotter, 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 (Pirttila et al., 2000; Lübeck et al., 2000; Manz et al., 2000). К недостаткам методов, основанных на флюоресценции *in situ* гибридизации, можно отнести 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).

Высокая чувствительность FISH позволяет обнаружить даже очень малые количества рРНК, присутствующие в покоящихся микроорганизмах, несмотря на то, что эти количества РНК в 2–3 раза меньше, чем в растущих клетках (Zarda et al., 1997). С этим может быть связана завышенная оценка активной микробной фракции в исследованиях, показавших, что вклад активных микроорганизмов в общую биомассу составляет от 40 до 60% (табл. 1). Таким образом, не абсолютное значение сигнала флуоресценции, а относительное увеличение количества рибосомальной РНК во времени указывает на активное физиологическое состояние микроорганизмов (Christensen et al., 1999). При использовании этого принципа подсчета число активных бактерий (3,8–4,8 • 10^8 клеток $г^{-1}$ почвы, FISH) в почве, активированной увлажнением или внесением глюкозы, составило от 5 до 10% от общего количества бактерий (5–9 • 10^9 клеток $г^{-1}$ почвы), окрашенного DAPI (Christensen et al., 1999).

Метод FISH часто используется для повышения чувствительности других инструментальных методов. Сочетание FISH с микроавторадиографией (FISH-MAR) позволяет проводить филогенетическую классификацию активных микроорганизмов (Nielsen, Nielsen, 2005; Rogers et al., 2007; Wagner, 2010). Сочетание FISH с спектроскопией комбинационного рассеяния света или со вторичной ионной масс-спектрометрией (NanoSIMS) позволяет наблюдать метаболическую активность отдельных клеток (Chandra et al., 2008; Tourna et al., 2011) и распределение микроорганизмов в среде обитания (Herrmann et al., 2007). Это также помогает следить за включением изотопно-меченых (^{14}C, ^{3}H) субстратов в биомолекулы, такие как нуклеиновые кислоты, белки, углеводы и липиды в живых микробных клетках (Huang et al., 2007). Однако в большинстве исследований современные методы анализа отдельных клеток, в основном, применяются для анализа метаболических функций клеток в чистых культурах, а не в нативных почвенных образцах (Musat et al., 2012).

Сочетание FISH с ^{14}C-мечеными субстратами и последующим анализом включения ^{14}C с помощью микроавторадиографии помогает не только выявить микроорганизмы, активно метаболизирующие субстрат, но и одновременно количественно оценить их вклад в общее микробное сообщество. Например, разложение ^{14}C-меченого нафталина и фенантрена таксонами *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, и *Actinobacteria* показало, что до 5% бактерий способны разлагать нафталин, в то время как доля микроорганизмов, разлагающих фенантрен, не превышала 1% от микробного сообщества (Rogers et al., 2007). Аналогично, бактерии, разлагающие симазин, составляли примерно 5% от общей численности популяции (Martínez-Inigo et al., 2010). Применение FISH позволило связать долю активных микро-

организмов с определенными функциями, например, показано, что половина обнаруженных архей были способны окислять аммиак, в то время как доля аммиак-окисляющих бактерий составляла лишь 4% от общего бактериального сообщества (Pratscher et al., 2011). В некоторых случаях интенсивность определенных процессов (например, потребление метана) может быть напрямую связано с количеством активных бактерий, способных осуществлять данный процесс. Так, сокращение интенсивности поглощения CH_4 на 14,5% при повышенной концентрации CO_2 объяснялось 54%-ным снижением числа метанотрофных бактерий, зафиксированным методом FISH (Kolb et al., 2005). В других исследованиях, однако, не обнаружено прямой зависимости между количеством активных бактерий и их функциональной активностью (Martínez-Inigo et al., 2010). Эффективное сочетание метода FISH с применением полиэтилентерефталатовых пленок, помещенных в почву, позволяет непосредственно контролировать изменения почвенных микробных сообществ (Moshynets et al., 2011). Такой подход очень перспективен для исследований пространственного распределения активных микроорганизмов *in situ*, в том числе их роста, конкуренции и растительно-микробных взаимодействий.

Применение микрочипов

Молекулы мРНК и рРНК могут быть подвергнуты обратной транскрипции для получения относительно стабильной комплементарной ДНК (кДНК) с одновременной флуорогенной маркировкой. После гибридизации таких образцов ДНК с набором олигонуклеотидных зондов, ориентированным на широкие группы микроорганизмов, анализ на микрочипах можно применять для мониторинга микробного сообщества. Таким образом, данный метод позволяет качественно и количественно определить активные таксоны микробного сообщества (с высоким уровнем мРНК и рРНК (Poulsen et al., 1993).

Было показано, что переход из покоящегося в активное состояние, индуцированный добавлением сахара и органических кислот, приводит к 25-кратному увеличению количества активных таксонов (Shi et al., 2011). Создание микрочипа высокой плотности для филогенетического анализа PhyloChip (Brodie et al., 2006) позволило оценить относительные изменения в соотношении ДНК и РНК в почве в течение 72 ч (Placella et al., 2012) и выделить филогенетически различающиеся группы с быстрой (15 мин – 1 ч), средней (1–3 ч), и длительной (3–72 ч) стратегией активации. Это соответствует нашей оценке времени отклика активных, потенциально активных и покоящихся микроорганизмов на поступление субстрата (рис. 1).

Чувствительность флуоресцентного сигнала при анализе микрочипов позволяет надежно различать целевые гены, так как интенсивность флуоресценции может отличаться на порядок для разных зондов (Pathak et al., 2011;

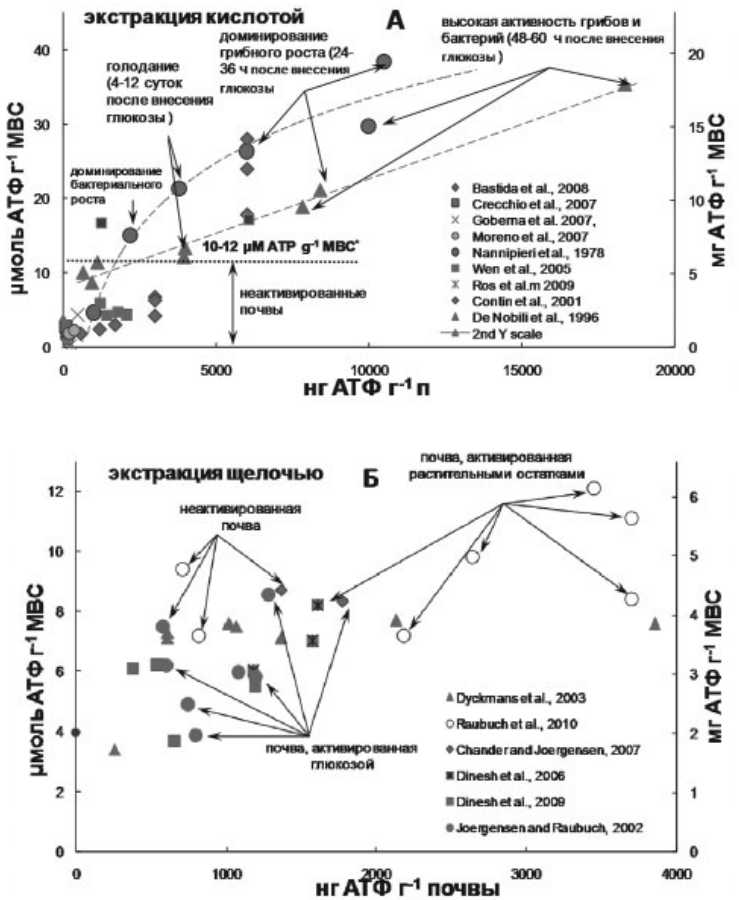

Рис. 1. Содержание АТФ, определенное методом экстракции кислотой (А) и щелочью (Б) в активированных и неактивированных почвах (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2013).

Urbanova et al., 2011). Несмотря на такую высокую чувствительность, применение технологии микрочипов для количественного определения ограничено низким выходом РНК при выделении из почвы, неспецифической флуоресценцией, а также ко-экстракцией гуминовых кислот с нуклеиновыми кислотами (Wang et al., 2011). В связи с этими трудностями анализ на микрочипах в основном сосредоточен на качественных изменениях в составе сообществ. Количественная зависимость между размером активных микробных таксонов и изменением экспрессии функциональных и филогенетиче-

ских генов до сих пор не определена (Wakelin et al., 2013). Таким образом, применение микрочипов еще не достигло полной реализации своего потенциала в почвенной микробиологии и экологии, и должно быть адаптировано для оценки активных микроорганизмов. В перспективе комбинация микрочипов (например, PhyloChip) с секвенированием 16S рРНК может быть использована для количественной оценки групп микроорганизмов и их вклада в общее микробное сообщество.

Применение кПЦР в реальном времени: определение численности таксономических групп микроорганизмов

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 (Stubner, 2002; Kabir et al., 2003; Kolb et al., 2003; Okano et al., 2004). 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 приходится на один организм. Наконец, во время кПЦР часть рРНК генов отдельных филогенетических групп может не амплифицироваться в результате кПЦР (Fierer et al., 2005).

Применение кПЦР в реальном времени: определение численности функциональных генов микроорганизмов

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* (азотфикасация), *amoA* (нитрификация), *mcrA* (метаногенез), *pmoA* (метанотрофия), *dsrAB* (диссимиляционная сульфатредукция).

Амплификация гена *amoA* архей и бактерий с помощью количественной ПЦР для определения и сравнения численности аммонийокисляющих архей и бактерий 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 pH 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 функции, не связанные с окислением 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, Boetius, 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 также найден в анаэробных метанокисляющих 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. Полученные многими результаты, подтвердили эффективность использования данного функционального и филогенетического маркера для оценки разнообразия и распространения метаногенов, в том числе в почвах (Lueders et al., 2001; Luton et al., 2002; Hallam et al., 2003; Kravchenko et al., 2015).

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.

Оценка общей микробной биомассы посредством ПЦР в реальном времени

Оценка активного пула микробной биомассы требует её количественного определения в одинаковых единицах. Определение популяций грибов, бактерий и архей с использованием таксон-специфичных праймеров к 18S рРНК и 16S рРНК, проводят при помощи ПЦР в реальном времени (qPCR и RT-PCR). При таком подходе число копий гена отображает размер целевой группы микроорганизмов. Тем не менее, оценка микробного углерода на основе числа копий гена остается проблематичной из-за отсутствия исследований, соотносящих количество микробного углерода (определяемого методами фумигации или субстрат-индуцированного дыхания) с количеством копий генов бактериальной и грибной 16S/18S рРНК. Поскольку каждая бактериальная или грибная клетка представлена, по крайней мере, одной копией гена, количество микробной биомассы можно грубо оценить по числу копий гена, используя коэффициент пересчета для микробного углерода. Такой подход справедлив для определенных групп микроорганизмов, например, для нитрат-редуцирующих и денитрифицирующих бактерий, а также для аммонифицирующих архей, у которые количество копий целевых генов (например, narG, nirK, nirS, nosZ и amoA) на клетку варьирует в относительно небольших пределах (от одной до трех) (Hallin et al., 2009). Однако в большинстве случаев количество общей бактериальной биомассы может быть сильно завышено при расчетах на основе числа копий гена 16S рРНК, так как количество копий рибосомных генов в прокариотной клетке обычно колеблется от 1 до 15 (Hallin et al., 2009). Тем не менее, результаты кПЦР часто вполне согласуются с альтернативными методами измерения биомассы (Rousk et al., 2010a). Так, максимальная бактериальная биомасса, рассчитанная при помощи анализа кПЦР (при допущении наличия одной копии гена на клетку и 20 фг углерода на клетку