

Разнообразие актинобактериальных сообществ в местах захоронения жидких отходов химического предприятия

© 2023. И. Г. Широких^{1,2}, д. б. н., в. н. с., профессор,
 Н. А. Боков², аспирант, Е. В. Дабах¹, к. б. н., с. н. с.,
 Л. В. Кондакова^{1,2}, д. б. н., профессор,
 Т. Я. Ашихмина^{1,2}, д. т. н., профессор, г. н. с., зав. лабораторией,
¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
 Российской академии наук,
 167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,
²Вятский государственный университет,
 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,
 e-mail: irgenal@mail.ru

На примере техносолей, сформировавшихся на территории бывшего хвостохранилища жидких отходов химического предприятия в долине реки Вятки, изучены состав и таксономическая структура филома Actinobacteria. Исследовано разнообразие актинобактерий в образцах почв, отобранных с трёх пространственно удалённых площадок мониторинга (СГ, СУ1 и СУ2), различающихся по комплексу физико-химических свойств и характеру растительного покрова. Результаты сопоставлены с фоном – аллювиальной почвой (ФП), отобранной на территории ГПЗ «Нургуш». Исследования проведены с использованием высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina и культуральным методом (посев). Культуральный метод выявил в составе актинобактериальных комплексов представителей родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и ряд олигоспоровых форм. Общая численность актиномицетов в образцах техносолей изменялась от $2,4 \cdot 10^4$ до $1,8 \cdot 10^5$ КОЕ/г, а в фоновой почве составила $8,5 \cdot 10^3$ КОЕ/г. Семейства актиномицетов, установленные методом посева, были обнаружены и с помощью метода ампликонного секвенирования участка V4 гена 16S рРНК. Молекулярный метод вместе с тем позволил выявить в исследуемых образцах и ряд других таксонов, в том числе, не имеющих культивируемых представителей или пока неклассифицированных. С помощью ампликонного секвенирования было установлено, что представители филома *Actinobacteria* в образцах техногенных почв являются абсолютными доминантами по относительному обилию в общем бактериальном разнообразии. Доля актинобактерий в этих почвах колеблется от 33 до 41%, тогда как в фоновой почве составляет только 22%. Actinobacteria в образцах техносолей были представлены семействами Micromonosporaceae, Micrococcaceae, Nocardioidaceae, Microbacteriaceae, Thermomonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Actinosynnemataceae и Intrasporangiaceae и др. Таксономический спектр актинобактерий в образце ФП был сходен с техносолями, но долевое соотношение таксонов при этом было иным. Полученные результаты будут использованы в дальнейших исследованиях почвенной актинобиоты в связи с изменениями экосистем, нарушенных хозяйственной деятельностью человека, а также представляют интерес для поиска и выделения природных штаммов актинобактерий в целях биотехнологии.

Ключевые слова: отходы химического производства, техносоли, актинобактерии, актиномицеты, разнообразие, таксономическая структура.

Diversity of active bacterial communities in the disposal sites of liquid waste of a chemical enterprise

© 2023. I. G. Shirokikh^{1,2}, ORCID: 0000-0002-3319-2729, N. A. Bokov², ORCID: 0000-0002-1000-1192,
 E. V. Dabakh¹, ORCID: 0000-0002-6088-4819, L. V. Kondakova^{1,2}, ORCID: 0000-0002-2190-686X,
 T. Ya. Ashikhmina^{1,2}, ORCID: 0000-0003-4919-0047

¹Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch
 of the Russian Academy of Sciences,
 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,
²Vyatka State University,
 36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
 e-mail: irgenal@mail.ru

SU2), differing in the complex of physico-chemical properties and the nature of the vegetation cover, was studied. The results were compared with the background soil (BS) – alluvial soil selected on the territory of the Nurgush State Nature Reserve. The studies were carried out using high-performance sequencing using Illumina technology and the culture method (seeding). The culture method revealed representatives of the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* and a number of oligospore forms in the actinobacterial complexes. The total number of actinomycetes in the samples of technosols varied from $2.4 \cdot 10^4$ to $1.8 \cdot 10^5$ CFU/g, and in the background soil was $8.5 \cdot 10^3$ CFU/g. Families of actinomycetes established by the seeding method were also detected using the amplicon sequencing of the V4 section of the 16S rRNA gene, but the molecular method made it possible to identify a number of other taxa in the studied samples, including those that do not have cultured representatives or are not yet classified. Using amplicon sequencing, it was found that representatives of the phylum Actinobacteria in samples of technogenically disturbed soils are absolute dominants in relative abundance in the total bacterial diversity. The proportion of actinobacteria in disturbed soils ranges from 33 to 41%, while in the background soil it is only 22%. Actinobacteria in the samples of technosols were represented by the families Micromonosporaceae, Micrococcaceae, Nocardioidaceae, Microbacteriaceae, Thermomonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Actinosynnemataceae, and Intrasporangiaceae, etc. The taxonomic spectrum of actinobacteria in the BS sample was similar to technosols, but the proportion of taxa was different. The results obtained will be used in further studies of soil actinobiota in connection with changes in ecosystems disrupted by human economic activity, and are also of interest for the search and isolation of natural strains of actinobacteria for biotechnology purposes.

Keywords: chemical production waste, technosols, actinobacteria, actinomycetes, diversity, taxonomic structure.

Актинобактерии – грамположительные прокариоты с высоким содержанием в ДНК гуанина и цитозина (57–75%), составляют один из крупнейших бактериальных филумов – Actinobacteria. Многие из них реализуют миксальный образ жизни и характеризуются сложной морфологической дифференциацией (актиномицеты). Актинобактерии повсеместно распространены как в водных, так и в наземных экосистемах, обладают поразительно широкими метаболическими возможностями, которые обусловлены их гораздо большим, в сравнении с другими бактериями, геномом [1]. Метаболический потенциал актинобактерий широко используется в производстве антибиотиков, иммуномодуляторов, противоопухолевых соединений [2, 3]. Как продуценты ферментов актинобактерии находят применение в производстве моющих средств, текстильной, перерабатывающей, пищевой, целлюлозно-бумажной, сельскохозяйственной и фармацевтической промышленности [4].

Актинобактерии широко распространены в почвах, особенно в сухих, слабокислых, богатых органическим веществом. Они составляют значительную долю от общей микробной биомассы почвы [2] и участвуют в трансформации и минерализации органических остатков, разлагают труднодоступные другим бактериям полимеры, участвуют в биогеохимических циклах азота, углерода, фосфора и других элементов [5].

Вместе с тем известно, что микробное разнообразие ещё далеко не изучено, и подавляющее большинство прокариотов (90–99%), присутствующих в естественных средах обитания, всё ещё предстоит изолировать и/или научиться культивировать [6]. Остаются

неисследованными или слабо изученными не только природные среды, но и техногенные почвенные образования, формирующиеся в результате различных видов производственной деятельности, которые тоже могут считаться ценным ресурсом для выделения малоизученных микроорганизмов [7], включая актинобактерии, многие из которых представляют промышленный интерес в качестве потенциальных кандидатов для будущих биотехнологических применений [8, 9]. Развитие в последние годы молекулярно-генетических методов даёт возможность более успешно решать задачи экологической оценки микробного разнообразия [10, 11].

Отходы промышленного производства являются сегодня одним из самых мощных факторов, оказывающих негативное воздействие на природные экосистемы. В целях предотвращения загрязнения окружающей среды отходы изолируются путём засыпки мест их хранения различными по свойствам грунтами. Этот процесс является неотъемлемой частью технического этапа рекультивации. Биологический этап предусматривает перекрытие насыпных грунтов плодородным слоем земли с последующим посевом трав или посадкой саженцев древесных культур. Однако при использовании для засыпки рыхлых природных материалов довольно быстро начинается процесс самозаращения территории складирования отходов, происходит формирование почвенного покрова. Так, вблизи г. Кирово-Чепецка Кировской области, после ликвидации в 2012 г. хранилища жидких отходов химических предприятий путём засыпки котлована песком, глиной, а также нетоксичными отходами производства (гипсом и известью), образовалась площадка с

выраженным микрорельефом. Благодаря наличию семян и зачатков в насыпном материале, а также вследствие их приноса ветром с окрестных территорий, площадка уже через год начала зарастать сорной растительностью, характерной для окружающего ландшафта, начался процесс почвообразования [12]. К настоящему времени появляются признаки дифференциации профиля, формирующиеся почвы относятся к техносолям (Technosols по WRB).

Цель работы – сравнительная оценка разнообразия актинобактериальных сообществ культуральным и молекулярно-генетическим методами в техногенных почвах, формирующихся на месте захоронения жидких отходов химического предприятия.

Объекты и методы

Объекты исследования. Образцы почв отбирали на территории бывшего хвостохранилища, расположенного в долине р. Вятки в зоне подтопления. До заполнения котлована твёрдым материалом – песком, глиной, гипсом с примесью извести – хранилище представляло собой водоём (площадь зеркала воды около 51 тыс. м²), в котором объём жидких отходов оценивался в 275 тыс. м³. С трёх площадок мониторинга СГ, СУ1 и СУ2, отражающих разнообразие формирующихся растительных ассоциаций на территории засыпанного хвостохранилища, из верхнего горизонта (0–10 см) отбирали по пять проб методом конверта и готовили методом квартования смешанный образец для каждой площадки. Для сравнения служил образец (фоновая почва – ФП), отобранный из верхнего горизонта слабокислой аллювиальной почвы ГПЗ «Нургуш», расположенного также в долине р. Вятки, но ниже по течению. Образцы различались по гранулометрическому составу: суглинок – СГ; супесь, подстилаемая карбонатным суглинком – СУ1; супесь – СУ2; содержанию органического углерода (1,6, 4,6 и 5,0% соответственно), показателям кислотности (7,7, 7,4 и 6,2 ед. рН_{с_{о_л}}), ионов азотной группы (до 260 мг/кг N-NO₃⁻), тяжёлых металлов и характеру растительности (злаково-бобовая ассоциация *Agropyron repens* Beauv. – *Lathyrus pratensis* L.; злаковая ассоциация *Agropyron repens* Beauv.; плотная тростниковая ассоциация *Phragmites communis* Trin). Аллювиальная почва фонового участка под устойчивой ассоциацией *Tilia cordata* Mill. (*T. parvifolia* Ehrh.) – *Matteuccia struthiopteris* L. Tod. характеризовалась суглинистым механическим

составом, наиболее низким значением рН_{с_{о_л}} 5,6, средним содержанием органического вещества С – 3,2%

Культуральный метод. Численность и структуру комплексов актиномицетов определяли при посеве из разведений почвенных суспензий на среду с пропионатом натрия и казеин-глицериновый агар (КГА) [13]. Каждый объединённый образец при посеве характеризовали двумя индивидуальными навесками. Для ограничения роста немикелиальных бактерий использовали селективный приём: прогревание почвы при 70 °С в течение 4 час. Инкубация посевов происходила при 28 °С в течение двух недель, после чего проводили дифференцированный учёт выросших колоний по морфотипам и выделение клонов для дальнейшей работы. Выделенные культуры хранили в пробирках со скошенной овсяной средой при температуре 4 °С. Морфологические признаки исследовали при помощи светового микроскопа Leica DM 2500 (Carl Zeiss, Германия).

Принадлежность выделенных культур актиномицетов к роду *Streptomyces* определяли на основании характерных морфологических признаков: нефрагментированный мицелий, длинные цепочки спор – на воздушном и отсутствие спор – на субстратном мицелии. Актиномицеты, имеющие одиночные споры на субстратном мицелии, лишённые или со слабым развитием стерильного воздушного мицелия, с не фрагментированным мицелием предварительно идентифицировали как представителей рода *Micromonospora*. Культуры, принадлежащие к роду *Streptosporangium*, определяли по наличию ветвящегося, не фрагментированного субстратного мицелия, не несущего споры, и воздушных гиф с цепочками спор и спорангиями. Актиномицеты, образующие одиночные споры на воздушном мицелии, либо короткие цепочки более крупных, чем стрептомицетные, спор на ветках воздушного и/или субстратного мицелия объединяли в группу олигоспоровых актиномицетов [14]. Видовую идентификацию стрептомицетов проводили по [15] на основании морфологических (форма цепочек спор) и культуральных (окраска воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимых и меланоидных пигментов на диагностических средах) признаков. На основании показателей долевого участия отдельных таксонов характеризовали родовую структуру комплексов на среде с пропионатом натрия, видовую структуру рода *Streptomyces* – на казеин-глицериновом агаре (КГА).

Молекулярно-генетический метод. Выделение из образцов тотальной почвенной ДНК и ампликонное секвенирование участка V4 гена 16S рРНК для выявления филогенетического разнообразия прокариот выполнены в Центре коллективного пользования «Геномные технологии и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ (Санкт-Петербург, г. Пушкин). Очищенный препарат ДНК служил в качестве матрицы в реакции ПЦР с универсальными праймерами к варибельному участку V4 гена 16S рРНК F515 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806 GGACTACVSGGGTATCTAAT [16]. Секвенирование осуществляли на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США), согласно рекомендациям производителя. Использовали метод парно-концевого чтения с генерацией не менее 20000 парных прочтений на образец.

Биоинформатическую обработку данных проводили с использованием пакета QIIME 2 [17]. Для удаления технических последовательностей в полученных сиквенсах использовали плагин q2-cutadapt. При помощи инструментов программы осуществляли проверку качества секвенирования и создание библиотеки сиквенсов. Для исправления ошибок использовали плагин DADA2 [18]. Классификацию репрезентативных последовательностей по таксонам проводили с восстановлением исходных флотипов (ASV, Amplicon sequence variant) и дальнейшей таксономической классификации полученных ASV. Использовали базу нуклеотидных последовательностей GreenGenes, версия 13_8, адаптированную к праймерам F515/R806. Порог классификации составлял 99%. Для оценки таксономического разнообразия при помощи того же алгоритма QIIME 2 были рассчитаны индексы альфа-разнообразия, при расчёте которых проводили нормализацию выборки по образцу с наименьшей глубиной секвенирования (3000 последовательностей). Альфа-разнообразие характеризовали с помощью нескольких показателей: индексов Шеннона, Чао1 и Симпсона [19]. Сравнение списков для четырёх образцов проводили с построением диаграмм с помощью интерактивного инструмента InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net/>) [20].

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Statgraphics. В таблицах приведены средние значения из трёх повторений и их стандартные отклонения при $P \geq 0,99$.

Результаты и обсуждение

Представители филума Actinobacteria были обнаружены во всех исследованных почвенных образцах. Общая численность актиномицетов, вырастающих при посеве на КГА, в образцах техносолой изменялась от $2,4 \cdot 10^4$ до $1,8 \cdot 10^5$ КОЕ/г, а в фоновой почве составила $8,5 \cdot 10^3$ КОЕ/г (табл. 1).

Выше всего долевого участие актиномицетов в прокариотном комплексе было в образце СГ (15,5%), близким значением характеризовался образец СУ1 (14,2%). В прокариотном комплексе образцов фоновой почвы и техносолы СУ2, отличающихся более кислой реакцией почвенного раствора (рН соответственно 5,4 и 6,2) доля актиномицетов была значительно ниже и составила соответственно 1,1 и 5,5% от всего количества культивируемых бактерий. Актиномицетные комплексы, исследованные с помощью культурального метода, включали представителей родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и ряд олигоспоровых форм. Комплексы техносолой в сравнении с ФП отличались более широким таксономическим разнообразием, включая представителей 3–4 родов и 8–9 цветковых секций и серий рода *Streptomyces*, в то время как в комплексе ФП отмечены представители трёх родов, а виды стрептомицетов отнесены всего к двум секциям и сериям – *Cinereus* *Achromogenes* и *Albus* *Albus*.

Относительная доля стрептомицетов в комплексах СГ (64,9%) и СУ2 (93,4%) многократно превосходила вклад других представителей мицелиальных прокариот, среди которых микромоноспоры (5,1–90,3%) выделялись более высоким относительным обилием, в сравнении с минорными компонентами, к числу которых в этих образцах были отнесены стрептоспорангии (1,6–8,6%) и олигоспоровые виды (0–3,7%). В образцах ФП (90,3%) и СУ1 (72,6%) по относительному обилию доминировали виды рода *Micromonospora*. Особенно низкой долей стрептомицетов, а также отсутствием олигоспоровых форм отличался комплекс фоновой почвы.

В целом, техносолы отличались от ФП более высокими показателями численности, долевого участия в прокариотном комплексе и таксономического разнообразия актиномицетов, вырастающих на питательных средах после обработки почвы селективным приёмом (прогрев почвы при 70 °С в течение четырёх часов). Среди образцов формирующихся почв наиболее благоприятными для актиномицетов

Таблица 1 / Table 1

Численность и структура комплексов актиномицетов в техносолях и фоновой почве по данным культурального метода / The number and structure of actinomycete complexes in technosols and background soil according to the cultural method

Показатель / Index	Почвенные образцы / Soil samples			
	СГ	СУ1	СУ2	ФП
Общая численность, тыс. КОЕ/г Total number, thousand CFU/g	177±42	24±5	55±19	8,5±2,1
Доля в прокариотном комплексе, % Share in the prokaryotic complex, %	15,5%	14,2%	5,5%	1,1%
Количество родов / Number of genera	4	3	4	3
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i> / Number of sections and series of the genus <i>Streptomyces</i>	9	9	8	2
Относительное обилие в комплексе представителей родов, % Relative abundance of representatives of genera in the complex, %	64,9	22,0	93,4	1,1
<i>Streptomyces</i>				
<i>Micromonospora</i>	29,8	72,6	5,1	90,3
<i>Streptosporangium</i>	1,6	5,4	1,35	8,6
олигоспоровые формы oligosporic forms	3,7	0	0,15	0

условиями отличался образец СГ с максимальным значением рН 7,7 и относительно низким содержанием $C_{орг}$ – 1,6%. Из загрязняющих веществ в данном образце обнаружен мышьяк в количестве, равном ОДК 10 мг/кг.

Актинобиота образца СУ2 отличалась от СГ на порядок меньшей численностью и втрое меньшей относительной долей в прокариотном комплексе, что может объясняться как более кислой реакцией среды рН 6,2, так и большей увлажнённой данного локуса ввиду более низкого положения в рельефе местности. Известно, что актиномицеты обычно приурочены к сухим почвам с щелочной реакцией [5].

Актиномицетный комплекс СУ1, несмотря на самое высокое в исследованном ряду почв содержание загрязняющих веществ (Sr 397–1150 мг/кг (фон 118 мг/кг), NO_3^- – 260 мг/кг (ПДК 140 мг/кг), характеризовался достаточно высокой долей актиномицетов (14,2%), очевидно, обусловленной снижением общей численности прокариот под воздействием фактора загрязнения. При этом обращает на себя внимание нетипичная для зональных почв родовая структура актинобактериального комплекса – с соотношением стрептомицетов и микромоноспор, смещённым в пользу микромоноспор, и отсутствием редких олигоспоровых видов, чувствительных к условиям среды. Структурные особенности актиномицетных сообществ в почвах, сформированных в месте захоронения отходов химического производ-

ства, таким образом, обусловлены комплексом физико-химических факторов и отражают специфику условий почвенной среды.

С помощью ампликонного секвенирования участка V4 гена 16S рРНК было установлено, что представители филума Actinobacteria в образцах техногенных почв являются абсолютными доминантами по относительному обилию ASV в общем бактериальном разнообразии. По молекулярным данным, их доля в техносолях изменялась от 33 до 41%, тогда как в фоновой почве составила только 22% (рис. 1, см. цв. вкладку III, табл. 2).

Эти результаты согласуются с данными, полученными культуральным методом (табл. 1). В составе филума во всех образцах обнаружены представители классов Thermoleophilia, Actinobacteria и порядка Acidimicrobiales. В образце ФП отнесенные к порядку Acidimicrobiales сиквенсы составили треть от всех актинобактерий и были представлены некультивируемыми формами.

Класс актинобактерий на 97–100% представлен порядком Actinomycetales как в техносолях, так и в фоновой почве. Чтобы оценить различия в составе актинобактериального сообщества, последовательно были таксономически классифицированы, где это было возможно, до уровня семейства. На тепловой карте, при кластеризации полученных данных автоматизированным алгоритмом, актинобактериальное сообщество образца ФП чётко

И. Г. Широких, Н. А. Боков, Е. В. Дабах, Л. В. Кондакова
 «Разнообразие актинобактериальных сообществ
 в местах захоронения жидких отходов
 химического предприятия». С. 174.

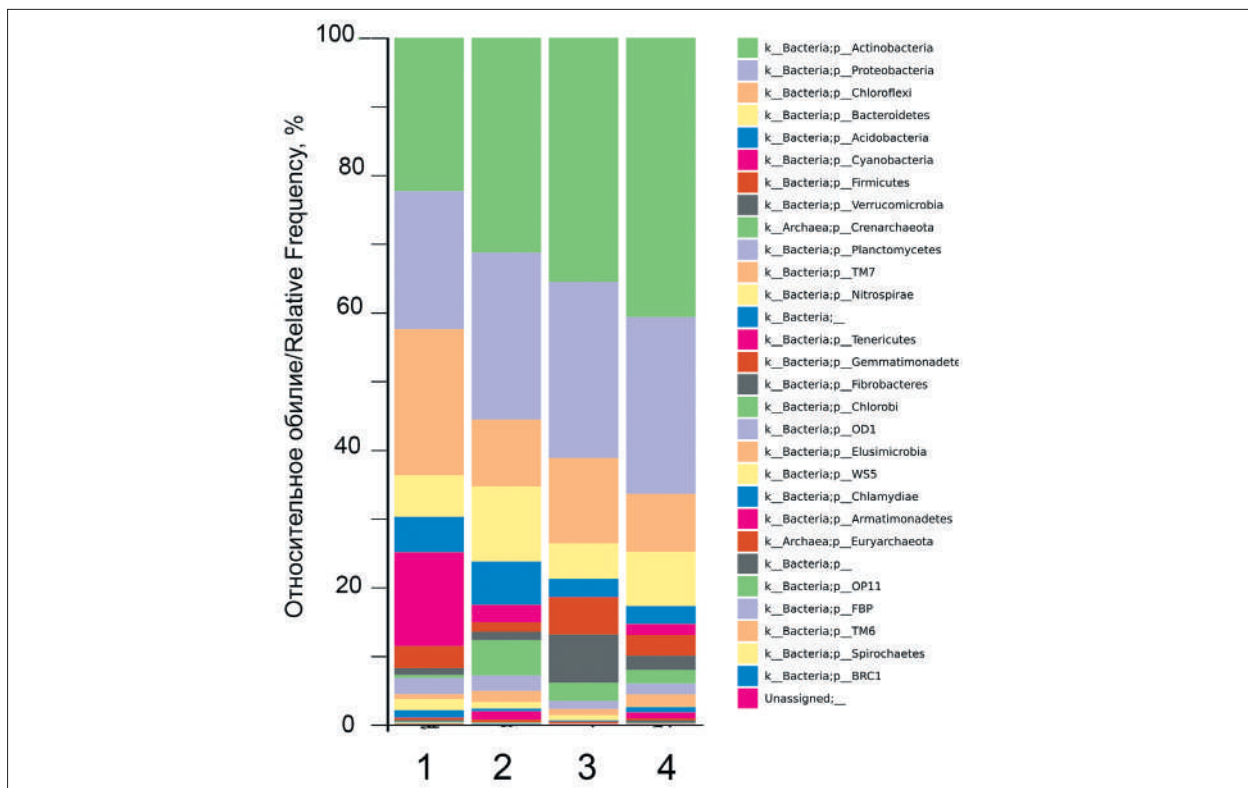


Рис. 1. Таксономическая структура микробиомов в техносолях и фоновой почве на уровне прокариотных филумов в образцах: 1– ФП, 2 – СГ, 3 – СУ1, 4 – СУ2
 Fig. 1. Taxonomic structure of microbiomes in technosols and background soil at the level of prokaryotic phyla in samples: 1– BS, 2 – SG, 3 – SU1, 4 – SU2

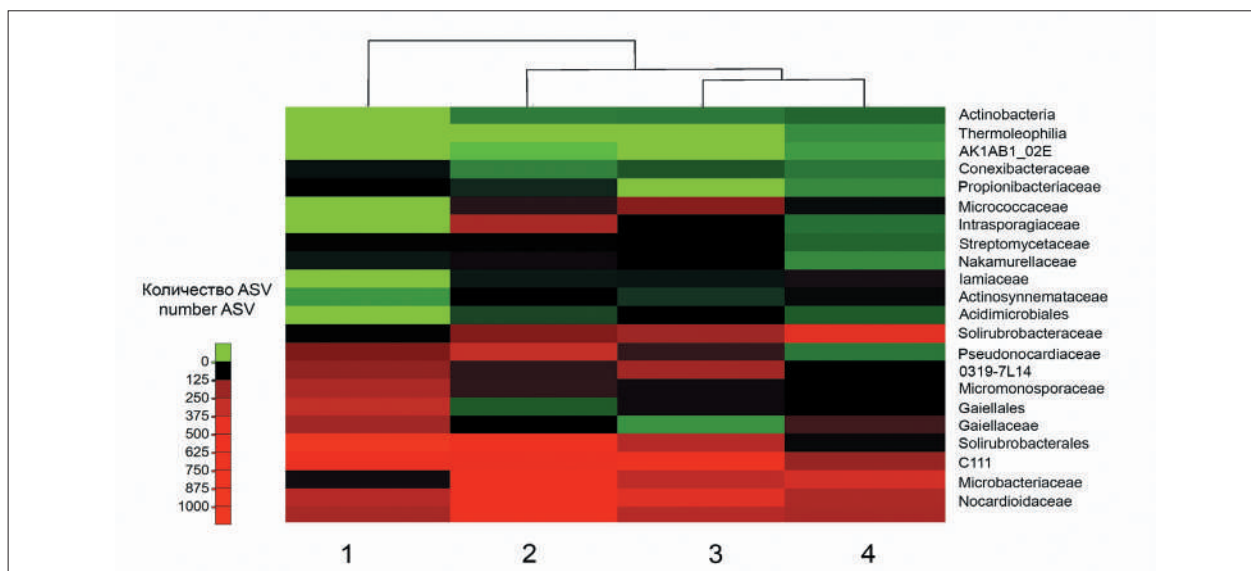


Рис. 2. Тепловая карта, отражающая количество ASV, соотнесённых с различными семействами класса Actinobacteria в образцах: 1– ФП, 2 – СГ, 3 – СУ1, 4 – СУ2
 Fig. 2. Heat map reflecting the number of Amplicon Sequence Variants (ASV) associated with different families of the Actinobacteria class in samples: 1– BS, 2 – SG, 3 – SU1, 4 – SU2

И. Г. Широких, Н. А. Боков, Е. В. Дабах, Л. В. Кондакова
 «Разнообразие актинобактериальных сообществ
 в местах захоронения жидких отходов
 химического предприятия». С. 174.

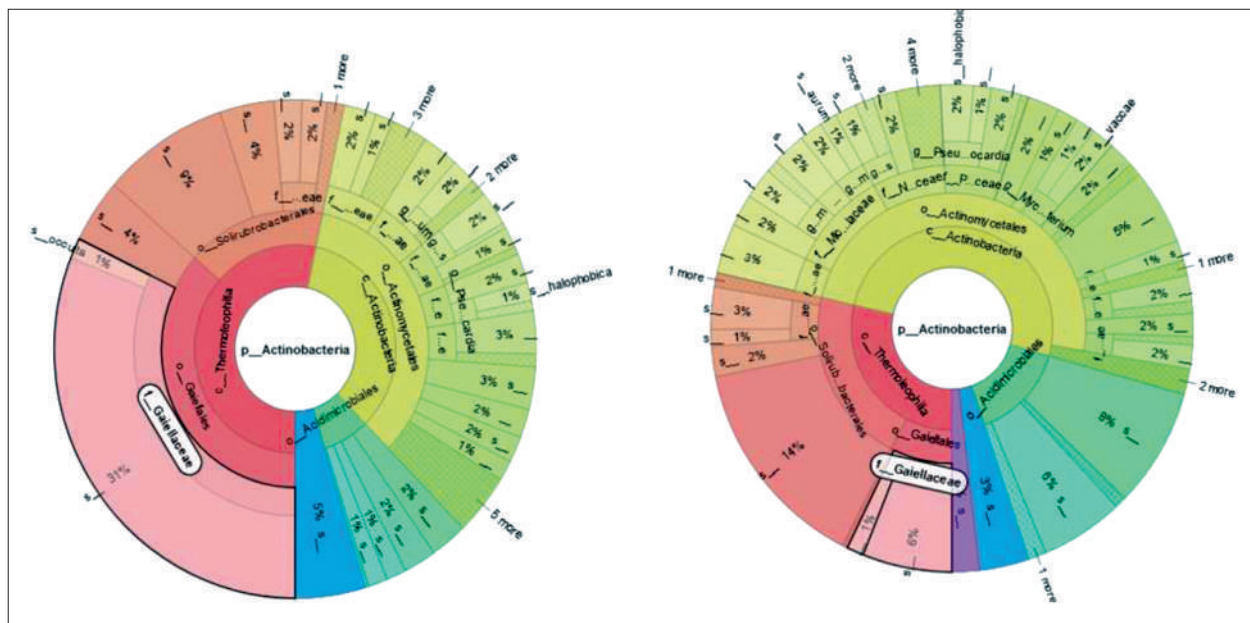


Рис. 3. Вклады в таксономическую структуру представителей филома Actinobacteria семейства Gaiellaceae в образцах ФП (слева) и СУ1 (справа)
 Fig. 3. Contributions to the taxonomic structure of representatives of the phylum Actinobacteria of the Gaiellaceae family in the BS (left) and SU1 (on right) samples

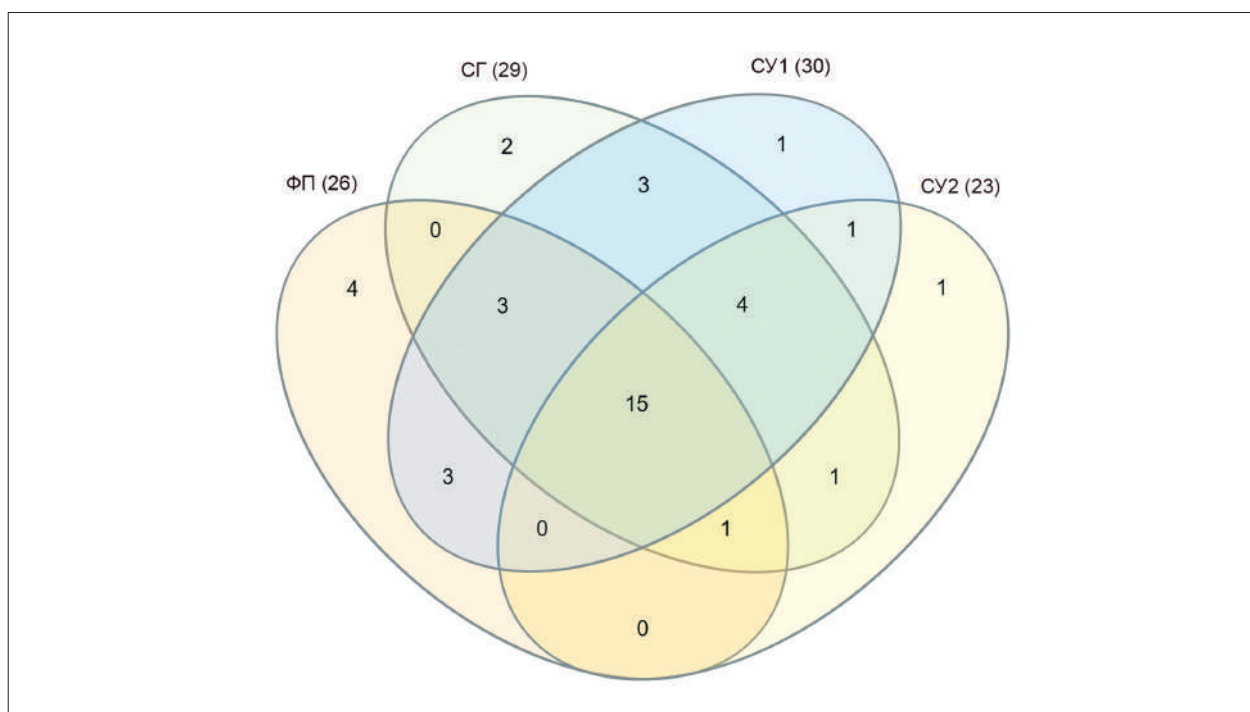


Рис. 4. Диаграмма Венна, отображающая число общих и уникальных семейств в образцах техносолей (СГ, СУ1 и СУ2) и природной фоновой почвы (ФП)
 Fig. 4. Venn diagram showing the number of common and unique families in the technosol samples (СГ, СУ1 and СУ2) and natural background soils (ФП)

отделено от трёх других образцов техносолой, объединённых в общий кластер (рис. 2, см. цв. вкладку III).

В зависимости от образца в таксономической структуре класса выявлено от 23 до 30 семейств (табл. 2). Наибольшее количество полученных последовательностей соотносено с семействами *Micromonosporaceae*, *Micrococcaceae*, *Nocardiodaceae*, *Microbacteriaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Actinosynnemataceae* и *Intrasporangiaceae*. В образцах техногенных почв, в отличие от ФП, не обнаружены ASV, принадлежащие актиномицетам из семейств *Frankiaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Cellulomonadaceae* и AKIW874. В то же время, в образце ФП отсутствовали представители семейств *Nakamurellaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Actinosynnemataceae*, *Rubrobacteraceae*, выявленные только в техносоях. Кроме того, относительная доля сиквенсов, соотносённых с *Microbacteriaceae* (20–26%) и *Nocardiodaceae* (15–26%) была значительно выше в образцах техногенных почв, а доля *Micromonosporaceae* (2–8%), напротив, ниже, чем в ФП (17%).

Установленные методом посева семейства актиномицетов *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* были обнаружены в образцах исследуемых

почв и с помощью метода ампликонного секвенирования. Количество ASV, отнесённых к этим таксонам в каждом образце (табл. 2), пропорционально относительному обилию таксона в актиномицетных комплексах, рассчитанному по данным посева (табл. 1).

Молекулярно-генетический метод позволил выявить в исследуемых образцах и ряд других таксонов, в том числе, не имеющих культивируемых представителей или неклассифицированных. Так, среди ASV, отнесённых к порядку *Acidimicrobiales*, в значительном количестве (от 158 в ФП до 699 в СГ) выявлены С111. Существенная доля сиквенсов была отнесена к семейству *Gaiellaceae* (класс *Thermoleophilia*) с одним ныне известным родом *Gaiella*. Особо многочисленными (11% от всего разнообразия прокариот) *Gaiellaceae* были в почве фонового участка, снижая свою представленность в 2,0–2,5 раза в техносоях. По данным секвенирования высокой численностью отличались также ASV, соотносённые с родами *Agromyces*, *Nocardioides*, *Salinibacterium*, *Pseudonocardia*, которые не были выявлены в образцах культуральным методом.

Доля представителей семейства *Streptomycetaceae*, согласно молекулярным данным, не превышала в образцах 1,2–2,0% (табл. 2). Столь

Таблица 2 / Table 2

Состав и филогенетическое разнообразие актинобактерий в техносоях и фоновой почве по данным молекулярного метода / Composition and phylogenetic diversity of actinobacteria in technosols and background soil according to the molecular method

Показатель / Index	Почвенные образцы / Soil samples				
	СГ	СУ1	СУ2	ФП	
Общее количество ASV, классифицированных как Actinobacteria / Total number of ASVs classified as Actinobacteria	6374	5760	4660	3001	
Доля ASV актинобактерий от общего бактериального разнообразия, % Share of ASV actinobacteria from total bacterial diversity, %	37	41	33	22	
Количество семейств Actinobacteria Number of Actinobacteria families	29	30	23	24	
Количество ASV, отнесённых к семействам / Number of ASVs assigned to families					
		84	85	98	38
	<i>Streptomycetaceae</i>	42	154	96	380
	<i>Micromonosporaceae</i> <i>Streptosporangiaceae</i>	0	41	0	35
Филогенетическое разнообразие / Phylogenetic diversity					
Индекс Шеннона / Shannon index	2,847	3,007	2,687	2,636	
Индекс Чао1 / Chao1 Index	29	30	23	26	
Индекс Симпсона / Simpson index	0,0759	0,0643	0,0880	0,1322	

низкие результаты по сравнению с данными культурального метода можно объяснить методическими особенностями исследования данной группы микроорганизмов. Из литературы известно, что использование универсальных праймеров в метагеномных исследованиях часто не позволяет выявлять полное филогенетическое разнообразие представителей семейства Streptomycetaceae, поскольку они (праймеры) проявляют недостаточное сродство к ДНК с высоким содержанием гуанина и цитозина, что типично для стрептомицетов [21, 22].

Анализ филогенетического разнообразия актинобактерий в исследуемых образцах показал, что в техносолях, за исключением образца СУ2, количество выявленных таксонов выше по сравнению с природной аллювиальной почвой ФП (табл. 2). Вместе с тем, в фоновой почве величина индекса Чао 1, оценивающего максимально возможное видовое богатство, выше – 26, чем количество выявленных таксонов – 24. Судя по соотношению этих показателей, в результате ампликонного секвенирования удалось выявить более чем 90% таксономического богатства актинобиоты природной почвы, тогда как в техносолях сопоставление этих величин указывает на более полное выявление таксономического богатства и филогенетического разнообразия молекулярным методом.

Индекс Шеннона, отражающий не только количество таксонов, но и их относительное обилие в сообществе, имел, как и индекс Чао1 наибольшее значение в образце СУ1, а индекс Симпсона, который служит также мерой доминирования, поскольку его величина полностью определяется долей 1–2 наиболее многочисленных видов [23], напротив, характеризовался минимальным значением среди исследованных почв. Соответственно в образце ФП индекс Шеннона был минимальным, а Симпсона – максимальным, что хорошо согласуется с выше приведёнными данными о превалировании среди актинобактерий в аллювиальной почве, в отличие от техносолей, представителей семейства Gaiellaceae (рис. 3, см. цв. вкладку IV).

Выявление общих и уникальных актинобактериальных таксонов в исследуемых образцах проводили путём построения диаграмм Венна. Проведённый анализ показал, что количество семейств в данных почвах составило 108 и большинство из них относятся к общим, т. е. представляют собой «коровый» компонент актинобиоты (рис. 4, см. цв. вкладку IV).

Общими для всех микробиомов являлись актинобактерии родов *Microbacterium*,

Salinibacterium, *Agromyces*, *Pseudonocardia*, *Nocardioides*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, некласифицированные представители семейств Conexibacteraceae, Solirubrobacteraceae, Micromonosporaceae, Gaiellaceae и порядка Acidimicrobiales.

Наибольшим количеством (21) общих с фоновой почвой таксонов характеризовался образец СУ1, минимальным (16) – СУ2. Наиболее близки между собой по составу актинобактерий были техносоли СГ и СУ1, включающие представителей 25 общих семейств. Акцессорный компонент в исследованных образцах включал ограниченное количество таксонов: от 4-х в образце ФП до 2-х в СГ и 1-го в СУ1 и СУ2. Таким образом, актинобиота всех исследованных почв характеризовалась высокой степенью сходства и включала лишь единичные уникальные таксоны.

Заключение

Сравнительные исследования актинобиоты почв (техносолей), сформированных в долине реки Вятки в процессе самозарастания территории бывшего хвостохранилища жидких отходов химического предприятия, были проведены с использованием двух методов – традиционного культурального (посев) и высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina. Это позволило охарактеризовать численность актинобиоты, таксономический состав и структуру, а также выявить характерные особенности, отличающие техносоли от природной аллювиальной почвы (фон).

Культуральным методом в составе актинобактериальных комплексов выявлены представители родов *Streptomyces* (сем. Streptomycetaceae), *Micromonospora* (сем. Micromonosporaceae), *Streptosporangium* (сем. Streptosporangiaceae) и ряд олигоспоровых форм, принадлежащих порядку Actinomycetales. Все семейства, установленные методом посева, были обнаружены и с помощью метода ампликонного секвенирования участка V4 гена 16S рРНК, но при этом в исследуемых образцах удалось выявить и ряд других таксонов, в том числе, пока не идентифицированных и/или не имеющих культивируемых представителей. Показано, что представители филума Actinobacteria в прокариотных сообществах образцов техногенных почв являются абсолютными доминантами по относительному обилию (от 33 до 41%). В различных образцах техносолей обнаружены

ASV, принадлежащие от 23 до 30 семействам в зависимости от физико-химических свойств почвы и характера растительности. Наиболее представительными в техногенных почвах были семейства *Micromonosporaceae*, *Micrococcaceae*, *Nocardioideae*, *Microbacteriaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Actinosynnemataceae* и *Intrasporangiaceae*. В образце фоновой почвы актинобактерии по своему таксономическому разнообразию были сходны с техносольями, но долевое соотношение между таксонами отличалось.

В целом, полученные двумя разными методами данные об актинобиоте почв, формирующихся на территории засыпанного хранилища жидких отходов химических предприятий, хорошо соответствуют друг другу, дополняют и расширяют существующие представления о распространении мицелиальных прокариот в природных и трансформированных хозяйственной деятельностью экосистемах, а также представляют интерес для поиска и выделения природных штаммов актинобактерий в целях биотехнологии.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме «Структура и состояние компонентов техногенных экосистем подзоны южной тайги» (государственная регистрация в ЕГИСУ № 122040100032-5).

Литература

1. Nett M., Ikeda H., Moore B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes // *Nat. Prod. Rep.* 2009. V. 9. P. 1362–1384.
2. Ait Barka E., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016. V. 80. No. 1. P. 1–43.
3. Salwan R., Sharma V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria // *Microbiological research.* 2020. V. 231. Article No. 126374.
4. Salwan R., Sharma V. The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes // *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* / Eds. B.P. Singh, V.K. Gupta, A.K. Passari. Elsevier, 2018. P. 165–177.
5. Goodfellow M., Williams S.T. Ecology of actinomycetes // *Annu. Rev. Microbiol.* 1983. V. 37. P. 189–216.
6. Bertola M., Ferrarini A., Visioli G. Improvement of soil microbial diversity through sustainable agricultural practices and its evaluation by-omics approaches: A per-

spective for the environment, food quality and human safety // *Microorganisms.* 2021. V. 9. No. 7. Article No. 1400.

7. Scholier T., Lavrinienko A., Brila I., Tukalenko E., Hindström R., Vasylenko A., Cayol C., Ecke F., Singh N.J., Forsman J.T., Tolvanen A., Matala J., Huitu O., Kallio E.R., Koskela E., Mappes T., Watts P.C. Urban forest soils harbour distinct and more diverse communities of bacteria and fungi compared to less disturbed forest soils // *Molecular Ecology.* 2023. V. 32. No. 2. P. 504–517.

8. Wink J., Mohammadipanah F., Kazemi Shariat Panahi H. Practical aspects of working with actinobacteria // *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* / Eds. J. Wink, F. Mohammadipanah, J. Hamedi. Springer, Cham, 2017. P. 329–376.

9. Nalini M.S., Prakash H.S. Actinobacteria: Diversity, plant interactions and biotechnology applications // *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture* / Eds. A. Yadav, J. Singh, A. Rastegari, N. Yadav. Springer, Cham, 2020. P. 199–244.

10. Fierer N., Lefter J.W., Adams B.J., Nielsen U.N., Bates S.T., Lauber C.L., Owens S., Gilbert J.A., Wall D.H., Caporaso G.J. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. No. 52. P. 21390–21395.

11. Caicedo-Montoya C., Gómez-Román M.P., Vázquez-Hernández M., Mora-Rincón R.A., Rodríguez-Luna S.D., Rodríguez-Sanoja R., Sanchez S. Evolutionary genomics and biosynthetic potential of novel environmental Actinobacteria // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2021. V. 105. No. 23. P. 8805–8822.

12. Кондакова Л.В., Дабах Е.В., Кислицына А.П. Формирование биоценоза на техногенных отходах // *Теоретическая и прикладная экология.* 2020. № 4. С. 129–135.

13. Петрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Петрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.

14. Bergey's manual of systematic bacteriology: V. 5: The Actinobacteria // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Eds. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, L. Wolfgang, W.B. Whitman. New York: Springer, 2012. 2031 p.

15. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.

16. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *The ISME journal.* 2011. V. 5. No. 5. P. 908–917.

17. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Cope E.K., Da Silva R.,

Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durall D.M., Duvallet C., Edwardson C.F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S., Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K.B., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciulek T., Kreps J., Langille M.G.I., Lee J., Ley R., Liu Y.X., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimey A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Pruesse E., Rasmussen L.B., Rivers A., Robeson M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S.J., Spear J.R., Swafford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., van der Hooft J.J.J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nature Biotechnology*. 2019. V. 37. P. 852–857.

18. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nature methods*. 2016. V. 13. No. 7. P. 581–583.

19. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М: Мир, 1992. 181 с.

20. Heberle H., Meirelles G.V., da Silva F.R., Telles G.P., Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams // *BMC bioinformatics*. 2015. V. 16. P. 1–7.

21. Кузнецова А.И., Иванова Е.А., Самылина О.С., Курбанова Ф.Г., Груздев Д.С., Канапацкий Т.А., Пименов Н.В. Прокариотные сообщества засоленных почв Приэльтонья в почвенной катене вдоль реки Хары // *Микробиология*. 2020. Т. 89. № 6. С. 658–674.

22. Schwientek P., Szczepanowski R., Ruckert C., Stoye J., Puhler A. Sequencing of high G+C microbial genomes using the ultrafast pyrosequencing technology // *J. Biotechnology*. 2011. V. 155. No. 1. P. 68–77.

23. Шитиков В.К., Розенберг Г.С. Оценка биоразнообразия: попытка формального обобщения // *Количественные методы экологии и гидробиологии (сборник научных трудов, посвященный памяти А.И. Баканова)*. Тольятти: СамНЦ РАН, 2005. С. 91–129.

References

1. Nett M., Ikeda H., Moore B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes // *Nat. Prod. Rep.* 2009. V. 9. P. 1362–1384. doi: 10.1039/b817069j

2. Ait Barka E., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., Van

Wezel G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016. V. 80. No. 1. P. 1–43. doi: 10.1128/mmbr.00019-15

3. Salwan R., Sharma V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria // *Microbiological research*. 2020. V. 231. Article No. 126374. doi: 10.1016/j.micres.2019.126374

4. Salwan R., Sharma V. The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes // *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* / Eds. B.P. Singh, V.K. Gupta, A.K. Passari. Elsevier, 2018. P. 165–177. doi: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00011-4

5. Goodfellow M., Williams S.T. Ecology of actinomycetes // *Annu. Rev. Microbiol.* 1983. V. 37. P. 189–216. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.001201

6. Bertola M., Ferrarini A., Visioli G. Improvement of soil microbial diversity through sustainable agricultural practices and its evaluation by-omics approaches: A perspective for the environment, food quality and human safety // *Microorganisms*. 2021. V. 9. No. 7. Article No. 1400. doi: 10.3390/microorganisms9071400

7. Scholier T., Lavrinienko A., Brila I., Tukalenko E., Hindström R., Vasylenko A., Cayol C., Ecke F., Singh N.J., Forsman J.T., Tolvanen A., Matala J., Huitu O., Kallio E.R., Koskela E., Mappes T., Watts P.C. Urban forest soils harbour distinct and more diverse communities of bacteria and fungi compared to less disturbed forest soils // *Molecular Ecology*. 2023. V. 32. No. 2. P. 504–517. doi: 10.1111/mec.16754

8. Wink J., Mohammadipanah F., Kazemi Shariat Pannahi H. Practical aspects of working with actinobacteria // *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* / Eds. J. Wink, F. Mohammadipanah, J. Hamedi. Springer, Cham, 2017. P. 329–376. doi: 10.1007/978-3-319-60339-1_11

9. Nalini M.S., Prakash H.S. Actinobacteria: diversity, plant interactions and biotechnology applications // *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture* / Eds. A. Yadav, J. Singh, A. Rastegari, N. Yadav. Springer, Cham, 2020. P. 199–244. doi: 10.1007/978-3-030-38453-1_7

10. Fierer N., Leff J.W., Adams B.J., Nielsen U.N., Bates S.T., Lauber C.L., Owens S., Gilbert J.A., Wall D.H., Caporaso G.J. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. No. 52. P. 21390–21395. doi: 10.1073/pnas.1215210110

11. Caicedo-Montoya C., Gómez-Román M.P., Vázquez-Hernández M., Mora-Rincón R.A., Rodríguez-Luna S.D., Rodríguez-Sanoja R., Sanchez S. Evolutionary genomics and biosynthetic potential of novel environmental Actinobacteria // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. V. 105. No. 23. P. 8805–8822. doi: 10.1007/s00253-021-11659-3

12. Kondakova L.V., Dabakh E.V., Kislitsyna A.P. Formation of biocenosis on technogenic waste // *Theoretical and Applied Ecology*. 2020. No. 4. P. 129–135 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2020-4-129-135

13. Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Workshop on Microbiology / Ed. A.I. Netrusov. Moskva: Akademiya, 2005. 608 p. (in Russian).
14. Bergey's manual of systematic bacteriology: V. 5: The Actinobacteria // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. M. Goodfellow, P. Kämpfer, H-J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, L. Wolfgang, W.B. Whitman. New York: Springer, 2012. 2031 p. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4
15. Gauze G.F., Preobrazhenskaya T.P., Sveshnikova M.A., Terekhova L.P., Maksimova T.S. Key to Actinomycetes. Genera *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. Moskva: Nauka, 1983. 248 p. (in Russian).
16. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // The ISME journal. 2011. V. 5. No. 5. P. 908–917. doi: 10.1038/ismej.2010.171
17. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Cope E.K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durall D.M., Duvallet C., Edwardson C.F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S., Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K.B., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciulek T., Kreps J., Langille M.G.I., Lee J., Ley R., Liu Y.X., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimey A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Pruesse E., Rasmussen L.B., Rivers A., Robeson M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S.J., Spear J.R., Swafford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., van der Hooft J.J.J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nature Biotechnology. 2019. V. 37. P. 852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
18. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nature methods. 2016. V. 13. No. 7. P. 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
19. Megarran E. Ecological diversity and its measurement. Moskva: Mir, 1992. 181 p. (in Russian).
20. Heberle H., Meirelles G.V., da Silva F.R., Telles G.P., Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams // BMC bioinformatics. 2015. V. 16. P. 1–7. doi: 10.1186/s12859-015-0611-3
21. Kuznetsova A.I., Ivanova E.A., Samylina O.S., Kurbanova F.G., Gruzdev D.S., Kanapatskiy T.A., Pimenov N.V. Prokaryotic communities of saline soils of the Elton region in the soil catena along the Khara River // Mikrobiologiya. 2020. V. 89. No. 6. P. 658–674. doi: 10.31857/S0026365620060117
22. Schwientek P., Szczepanowski R., Ruckert C., Stoye J., Puhler A. Sequencing of high G+C microbial genomes using the ultrafast pyrosequencing technology // J. Biotechnology. 2011. V. 155. No. 1. P. 68–77. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.04.010.
23. Shitikov V.K., Rozenberg G.S. Biodiversity assessment: an attempt at formal generalization // Quantitative methods of ecology and hydrobiology (collection of scientific papers dedicated to the memory of A.I. Bakanov). Tolyatti: SamNTs RAN, 2005. P. 91–129 (in Russian).