

ДИНАМИКА ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО МИКРОБИОМА СОЛОМЫ ПРИ ЕЕ РАЗЛОЖЕНИИ НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЧВЫ*

**О.В. ОРЛОВА[✉], Г.В. ГЛАДКОВ, А.О. ЗВЕРЕВ, В.М. ШАПКИН,
Т.О. ЛИСИНА, Н. КУРЧАК, А.А. КИЧКО, И.А. АРХИПЧЕНКО,
Е.Е. АНДРОНОВ**

Технологии no-till приобретают все большее распространение, поскольку позволяют получать высокие урожаи с меньшими затратами, при этом снижая деградацию почв (G.A. Thomas с соавт., 2007). Одним из ключевых вопросов при no-till остается регулирование количества и качества мульчи. При no-till обязательно использование гербицидов и пестицидов, что увеличивает опасность накопления в мульче их остаточного количества. Для решения этих проблем может использоваться разработанный во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии биологически активный препарат БАГС, способный разлагать прометрин и обладающий высокой целлюлозолитической активностью. В настоящей работе впервые показано значительное изменение сукцессии и состава микробиомов соломы под влиянием БАГС, однако, несмотря на повышение активности микроорганизмов, за 68 сут существенного роста эффективности деструкции в варианте с биопрепаратом не обнаружено. Цель работы — изучить динамику про- и эукариотического микробиомов соломы в условиях, когда ее разложение происходит на поверхности почвы в присутствии препарата БАГС. Лабораторный опыт с компостированием соломы овса (*Avena sativa* L.) на поверхности почвы был поставлен в пластиковых контейнерах объемом 1 л. На поверхность почвы укладывали капроновую ткань, на которую помещали по 15 г измельченной соломы. Предварительно солому замачивали на 2 ч в растворе NH_4NO_3 из расчета 5 г N/kg соломы. Контролем служила солома без обработки препаратом БАГС. В опытном варианте во влажную солому вносили 10 % БАГС. В начале опыта и через 30 и 68 сут в соломе определяли численность грибов и бактерий методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), содержание нитратов, водорастворимого углерода, зольность и дыхание, а также общую потерю массы. В те же сроки проводили анализ прокариотических и эукариотических микробных сообществ соломы при помощи глубокого секвенирования ампликонных библиотек гена 16S рРНК (прокариоты) и ITS (эукариоты). Солома овса быстро разлагалась — на 30-е сут потеря массы составила 31-35 %. Внесение БАГС увеличило выделение углекислоты на 30-е сут (569 ± 36 против 394 ± 67 мг $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ в контроле), на 68-е сут разница составляла 8 %. Высокая активность микроорганизмов привела к большому потреблению ими легкодоступных питательных веществ, что было видно по уменьшению количества водорастворимых органических соединений в 1,6-1,8 раза и нитратного азота в 1,8-1,4 раза относительно контроля. Вероятно, в условиях опыта недостаток минерального азота стал одним из факторов слабой эффективности БАГС как деструктора соломы по сравнению с контролем: на 68-е сут зольность оказалась выше на 11,6 %, а потеря массы соломы — на 5 %. Пересчет абсолютного числа копий гена 16S рРНК и ITS (ПЦР-РВ) в число клеток показал, что при деструкции соломы численность бактерий превышала численность грибов в 3,6-4,1 раза, однако, если учесть разницу в массе и объеме про- и эукариотических клеток, биомасса грибов может превышать бактериальную в сотни (до 500) раз. Анализ альфа-разнообразия для грибов выявил классическую картину сукцессии (низкий индекс Шеннона и меньшее число видов в начале опыта с последующим ростом биоразнообразия), что может служить косвенным подтверждением ведущей роли грибов в процессе деструкции соломы. Показано, что до 60 % представителей исходных прокариотического и эукариотического сообществ соломы не принимали значимого участия в ее разложении и замещались другими микроорганизмами. Наибольшие изменения состава микробиомов происходили в течение первых 30 сут, различия между показателями на 30-е и 68-е сут оказались невелики. Наряду с грибами при анализе эукариот (ITS) были выявлены и другие их представители, в частности растения, нематоды и протисты. Нематоды и протисты занимали заметное место в микробиоме — соответственно до 17,9 и 21,4 %. Биопрепарат БАГС оказал существенное влияние на эукариотическое сообщество на 30-е и 68-е сут: относительная представленность протистов возросла в 4-10 раз по сравнению с контролем, уменьшилась роль базидиомицетов. На 68-е сут соотношение аскомицетов и базидиомицетов составляло соответственно 1,49 и 4,30. Доля *Coprinospis radiata* (навозник радиальный) уменьшилась на 30-е сут в 2 раза, а на 68-е сут — в 11 раз. Биопрепарат БАГС в условиях нашего эксперимента слабо повлиял на численность микроорганизмов и скорость деструкции соломы за 68 сут, однако под его воздействием существенно изменялась

* Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Работы были проведены за счет финансовой поддержки гранта РФНФ 23-16-00147.

структура про- и эукариотических микробных сообществ и их сукцессия. Условия повышения эффективности применения БАГС, учитывая его потенциал по деградации пестицидов, предполагается более детально проанализировать в дальнейших экспериментах.

Ключевые слова: мульча, БАГС, ген 16S рРНК, ITS, ПЦР в реальном времени, qPCR, высокопроизводительное секвенирование, деструкция соломы овса, сукцессия микробных сообществ.

В настоящее время особое внимание уделяется ресурсосберегающим почвозащитным технологиям обработки почвы (1-3). Нулевая (no-till) технология характеризуется формированием мульчирующего слоя и прямым посевом семян в необработанную почву, что снижает антропогенное воздействие на экосистемы. Это позволяет получать высокие урожаи, способствует восстановлению деградированных почв и сокращает энергетические, трудовые и финансовые затраты.

Преимущества no-till связаны в первую очередь с созданием и сохранением мульчирующего слоя (не менее 3-5 см) из растительных остатков предшествующих культур, что благоприятствует накоплению и сохранению большего количества влаги в корнеобитаемом слое почвы (1, 4, 5), снижению водной и ветровой эрозии (1, 5, 6), повышению биологической активности почв и росту содержания в них органического вещества (5, 6). Среди недостатков no-till отмечают увеличение засоренности посевов (1, 7, 8), повышенное поражение растений болезнями и вредителями (1, 3, 7, 8), снижение всхожести как следствие влияния фенолкарбоновых кислот и аллелохимикатов, которые выделяются из соломы при ее разложении (3, 7), дифференциацию пахотного слоя по степени плодородия (3, 6, 9). Наиболее сильно эти недостатки проявляются при большом количестве послеуборочных остатков и в годы перехода на новые технологии. Следовательно, как достоинства, так и многие из недостатков приемов no-till связаны с количеством неразложившейся мульчи, что ставит задачу по регулированию ее деструкции.

Один из способов сделать это — применение биопрепаратов для ускорения трансформации послеуборочных растительных остатков (10-12). При no-till обработке обязательно использование гербицидов и пестицидов, что увеличивает опасность накопления их остаточного количества в мульче (3, 8, 13), поэтому биопрепараты должны быть устойчивы к этим ксенобиотикам или разлагать их. В качестве такого биологически активного препарата может рассматриваться БАГС, который способен разлагать прометрин (14) и при этом обладает высокой целлюлозолитической активностью. Препарат разработан во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии (15).

Процесс разложения соломы в почве и на ее поверхности существенно различается не только по физико-химическим условиям, но и по степени участия почвенных микроорганизмов. Большинство работ посвящены разложению пожнивных остатков, внесенных в почву, и их влиянию на ее плодородие. Поэтому представляет значительный интерес изучить микробиологические процессы при разложении мульчи и влияние на них биопрепарата.

В настоящей работе впервые представлены результаты лабораторного испытания биопрепарата БАГС в качестве ускорителя разложения мульчи (солома овса) и определена динамика структуры прокариотических и эукариотических микробных сообществ соломы с помощью глубокого секвенирования ампликонных библиотек для гена 16S рРНК и ITS. Показано значительное изменение сукцессии и состава микробиомов соломы под влиянием БАГС, однако, несмотря на повышение активности микроорга-

низмов, за 68 сут существенного роста эффективности деструкции в варианте с биопрепаратом мы не обнаружили.

Цель работы — изучить динамику про- и эукариотического микробиомов соломы в условиях, когда ее разложение происходит на поверхности почвы в присутствии препарата БАГС.

Методика. Опыт по компостированию соломы овса (*Avena sativa* L.) (зольность $7,83 \pm 0,06$ %, C:N 42,7) на поверхности почвы (чернозем, $S_{\text{общ.}} = 4,48 \pm 0,06$ %, $N_{\text{общ.}} = 0,394 \pm 0,002$ %, $pH_{\text{вод.}} = 6,31 \pm 0,01$) проводили в пластиковых контейнерах объемом 1 л. На поверхность почвы укладывали капронную ткань (для удобства определения потерь массы соломы), на которую помещали по 15 г измельченной соломы. Предварительно солому замачивали на 2 ч в растворе NH_4NO_3 из расчета 5 г N/кг соломы. В опытном варианте вносили 10 % БАГС, контролем служила солома без обработки биопрепаратом (по 9 контейнеров на вариант). Влажность в сосудах поддерживали периодическим опрыскиванием с помощью пульверизатора.

В начале опыта (0 сут), через 30 и 68 сут определяли массу соломы, основные химические характеристики процессов ее разложения и проводили высокопроизводительное секвенирование ампликонных библиотек гена 16S рРНК (прокариоты) и ITS (эукариоты).

ДНК выделяли в 4-кратной повторности из навесок соломы 0,5 г при помощи набора NucleoSpin Soil Kit («Macherey-Nagel GmbH & Co. KG», Германия) согласно протоколу производителя. Качество ДНК определяли электрофоретически, концентрацию — флуориметрически с использованием прибора Qubit fluorimeter («Invitrogen», США).

Ампликонные библиотеки получали с парами праймеров f515 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'/r806 5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3' для участков прокариотических генов 16S рРНК и ITS3 5'-GCATCG-ATGAAGAACGCAGC-3'/ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' для последовательностей эукариотических ITS при помощи ПЦР на приборе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad Laboratories», США) согласно стандартному протоколу (16-18).

Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов (секвенатор Illumina MiSeq, «Illumina, Inc.», США) определяли согласно стандартному протоколу производителя. Анализ прочтений осуществляли на основе пакетов dada2 (v1.14.1) (19), phyloseq (v1.30.0) (20) в программной среде R (v.4.2.0). Основными этапами обработки были фильтрация по качеству, формирование вариантов ампликон-сиквенсов (amplicon sequence variants, ASVs), таксономическая аннотация, удаление химерных последовательностей. При таксономической аннотации в качестве референсных использовали базы SILVA (v.138.1) для последовательностей гена 16S рРНК (21) и UNITE для последовательностей ITS (22).

Различия между полученными микробиомами количественно оценивали на двух уровнях — альфа-разнообразия (внутри выборки) и бета-разнообразия (между выборками). Для расчета индексов альфа-разнообразия ампликонные библиотеки были нормализованы методом разрежения по минимальному размеру. Оценка альфа-разнообразия включала определение общего числа ASVs, индекса Шеннона и обратного индекса Симпсона. Визуализацию бета-разнообразия проводили методом неметрического многомерного шкалирования (non-metric multidimensional scaling, NMDS) по дистанции Брея-Кертиса. Для расчета индексов разнообразия и визуализации данных использовали пакеты vegan (2.6.8) (<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>), phyloseq (1.44.0) и tidyverse (2.0.0) (20, 23).

Число копий генов 16S рРНК и ITS на 1 г образца определяли

методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с праймерами Eub338 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'/Eub518 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' для бактерий (24) и ITS1f 5'-TCCTAGGTGAACCTGCGG-3'/5.8s 5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3' для грибов (25) на приборе QuantStudio5 («Thermo Fisher Scientific», США). Использовали реактивы PowerTrack SYBR Green Master Mix («Thermo Fisher Scientific», США) согласно рекомендациям производителя, а также матричную ДНК в 10-кратном разведении, объем реакционной смеси 10 мкл. Стандартами служили серии 10-кратных разведений фрагментов 16S рДНК *Escherichia coli* и *Helicobacter pilori* и ITS *Saccharomyces cerevisiae*. Амплификацию и количественные измерения проводили с использованием системы CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», Германия) по протоколу 3 мин при 95 °С; 20 с при 95 °С, 20 с при 50 °С, 20 с при 72 °С (40 циклов). ПЦР-РВ выполняли в 3-кратной повторности. Для определения числа клеток прокариот и грибов в образцах абсолютное число копий гена 16S рРНК и ITS умножали на коэффициенты соответственно 0,20 и 0,05 (26).

Зольность и содержание общего азота в соломе определяли общепринятыми методами (27). Потерю массы соломы измеряли при взвешивании на аналитических весах E42 («Gibertini Elettronica S.R.L.», Италия). Функциональную активность сообщества микроорганизмов оценивали по дыханию методом И.Н. Штатнова (28) в 5-кратной повторности и по содержанию нитратного азота и водорастворимого углерода (соотношение солома:вода 1:10) в 4-кратной повторности из среднего образца. Содержание органического углерода в водной вытяжке определяли сжиганием в хромовой смеси по Н.С. Паникову с соавт. (29) в сушильном шкафу с детекцией на спектрофотометре (Ultraspec, «ЛКВ», Швеция) при $\lambda = 340$ нм. Содержание нитратного азота измеряли с салицилатом натрия на фотокolorиметре КФК 2 (АО «ЗОМЗ», Россия).

Статистическую обработку результатов химических анализов осуществляли в программе Microsoft Excel. Рассчитывали средние значения (M) и стандартное отклонение ($\pm SD$) не менее чем для трех повторностей. Для оценки достоверности различий между микробиомами по альфа-разнообразию использовали дисперсионный анализ с тестом Тьюки в составе пакета rstatix (0.7.2) (<https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>).

Результаты. Опыт по изучению динамики про- и эукариотического микробиомов соломы мы проводили с добавлением БАГС — препарата на основе природного консорциума микроорганизмов, формирующегося при компостировании торфо-соломисто-минеральной смеси и способного к минерализации труднорастворимых органических соединений как искусственного (пестициды), так и естественного (гуматы, лигноцеллюлозный комплекс) происхождения (14, 15).

1. Химические показатели соломы овса (*Avena sativa* L.) при разложении на поверхности почвы в зависимости от присутствия БАГС ($M \pm SD$)

| Показатель | Контроль | | | БАГС | | |
|---|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 0 сут | 30 сут | 68 сут | 0 сут | 30 сут | 68 сут |
| Потери массы соломы, г/сосуд ($n = 4$) | 0 | 4,98 \pm 0,76 | 6,81 \pm 0,37 | 0 | 4,66 \pm 0,05 | 6,83 \pm 0,05 |
| Зольность, % ($n = 4$) | 7,83 \pm 0,06 | 9,70 \pm 0,62 | 12,55 \pm 0,56 | 9,05 \pm 0,08 | 9,83 \pm 0,08 | 14,01 \pm 0,70 |
| Дыхание, $CO_2 \cdot M^{-2} \cdot ч^{-1}$ ($n = 5$) | Не определяли | 394 \pm 67 | 635 \pm 128 | Не определяли | 569 \pm 36 | 686 \pm 38 |
| Углерод водорастворимый, С мг/100 г ($n = 4$) | 1180 \pm 50 | 306 \pm 3 | 411 \pm 54 | 1202 \pm 44 | 188 \pm 8 | 227 \pm 10 |
| Нитраты, N-NO ₃ мг/100 г ($n = 4$) | 25,0 \pm 3,2 | 70,9 \pm 0,0 | 50,1 \pm 8,9 | 28,4 \pm 4,4 | 37,0 \pm 7,0 | 35,9 \pm 4,0 |

Солома овса, содержащая значительное количество водораствори-

мых органических веществ ($1,18 \pm 0,05$ г/100 г) и дополнительно обогащенная минеральным азотом, быстро разлагалась — на 30-е сут потеря массы составила 31-35 % (табл. 1). При внесении БАГС на 30-е сут увеличилось выделение углекислого газа (569 ± 36 против 394 ± 67 мг $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ в контроле), а на 68-е сут разница составляла 8 %. Высокая активность микроорганизмов привела к большому потреблению ими легкодоступных питательных веществ, что было видно по уменьшению количества водорастворимых органических соединений в 1,6-1,8 раза и нитратного азота в 1,8-1,4 раза относительно контроля. Вероятно, в условиях опыта недостаток минерального азота стал одним из факторов слабой эффективности БАГС как деструктора соломы по сравнению с контролем: на 68-е сут зольность оказалась выше на 11,6 %, потеря массы соломы — на 5 %.

Результаты ПЦР-РВ нередко используют для сравнения обилия про- и эукариот в образце (26). В нашем опыте через 30 сут их число увеличилось в среднем на 2 порядка от исходного (рис. 1) и сохранялось таким до 68-х сут. В начале эксперимента мы наблюдали увеличение численности прокариот и эукариот в варианте с биопрепаратом относительно контроля, что, вероятно, было связано с исходно высоким числом микроорганизмов в БАГС (15). Число бактерий в 1 г субстрата, рассчитанное на основании числа копий гена 16S рРНК, начиная с 30-х сут, оказалось в 3,6-4,1 раза выше, чем аналогичный показатель для грибов.

Известно, что у грибов и бактерий число копий гена 16S рРНК и ITS варьирует в широких пределах (26). Кроме того, клетки бактерий и грибов имеют разный объем (и, как следствие, биомассу) и неодинаковые метаболические возможности. Поэтому мы сопоставили данные ПЦР-РВ с показателями биомассы. Известно, что средний объем клетки эукариот и прокариот соотносится приблизительно как 2000:1, различие по массе клеток также близко к этому соотношению (30). Следовательно, хотя численность эукариот по данным ПЦР-РВ была меньше, биомасса могла превышать бактериальную 500-кратно. Это указывает на увеличение вклада грибов в разложение соломы, подтверждая мнение многих исследователей о большей биомассе и значительной роли этой таксономической группы в деструкции соломы (31, 32).

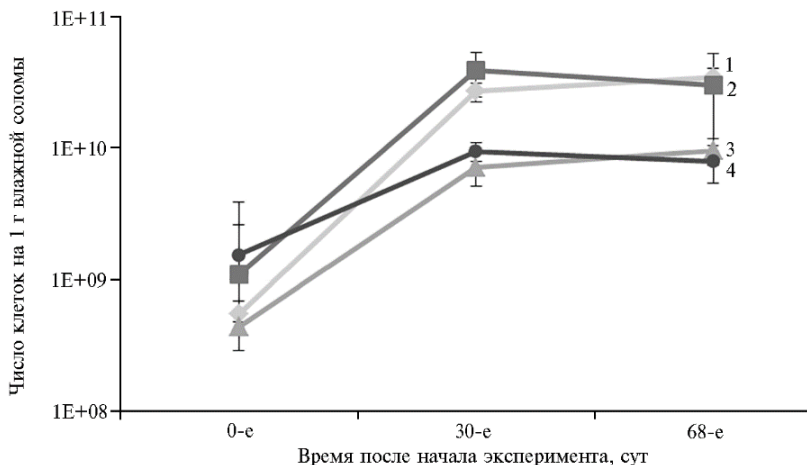


Рис. 1. Динамика микробиоты соломы овса (*Avena sativa* L.) при разложении на поверхности почвы в зависимости от присутствия БАГС: 1 — бактерии (контроль), 2 — бактерии (БАГС), 3 — грибы (контроль), 4 — грибы (БАГС) ($n = 3$, $M \pm SD$). Показатели рассчитывали на основании данных ПЦР-РВ о числе копий гена 16S рРНК и ITS.

По результатам секвенирования для прокариот (по гену 16S рРНК)

было получено в общей сложности 1578759 прочтений, из 830049 которых прошли фильтры качества. В анализе использовали данные 24 образцов со средней глубиной секвенирования 23056 прочтений на образец, их средняя длина составила 253 п.н. Для эукариот (ITS) получили 1592145 прочтений, из которых 678809 прошли фильтры качества. Средняя глубина секвенирования ITS (тоже 24 образца) составила 19394 последовательности на образец, длина полученных прочтений варьировала от 160 до 450 п.н.

Для анализа альфа-разнообразия использовали метод разрежения числа последовательностей до минимальной глубины 11378 последовательностей на образец для прокариот и 7271 последовательность — для эукариот.

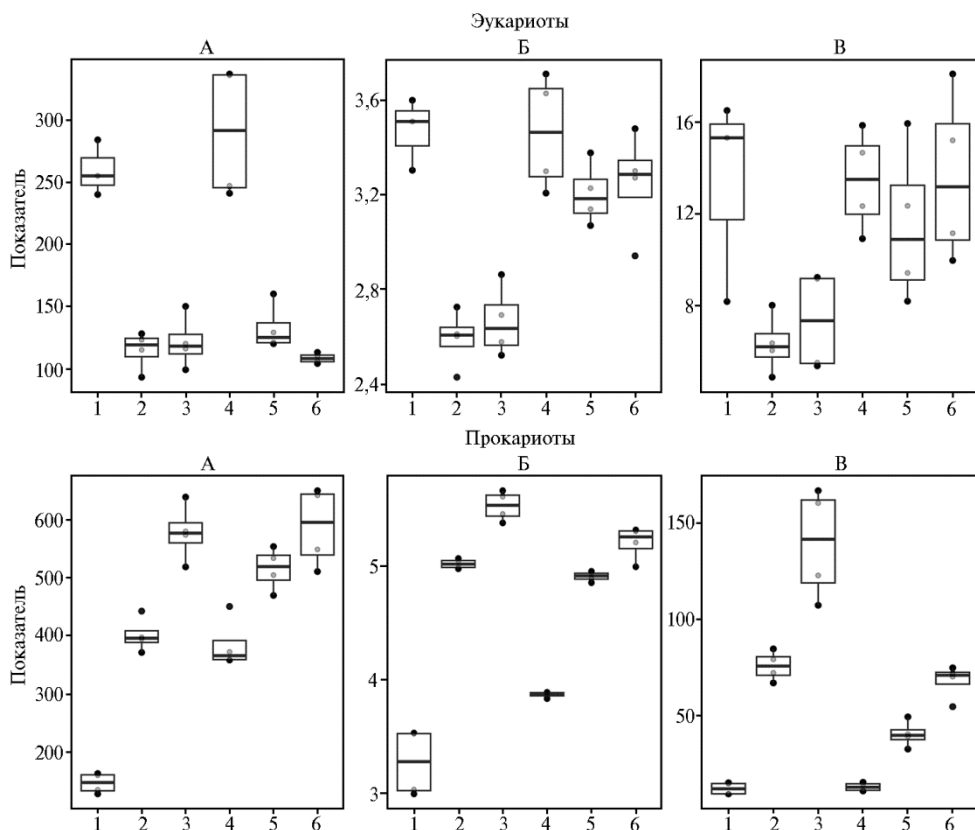


Рис. 2. Индексы альфа-разнообразия — число ASVs (amplicon sequence variants, А), индекс Шеннона (Б), обратный индекс Симпсона (В) для эукариот и прокариот в соломе овса (*Avena sativa* L.) в контроле и при ее обработке БАГС: 1 — солома + N_{мин.} (0-е сут), 2 — солома + N_{мин.} (30-е сут), 3 — солома + N_{мин.} (68-е сут) (контроль); 4 — солома + N_{мин.} + БАГС (0-е сут), 5 — солома + N_{мин.} + БАГС (30-е сут), 6 — солома + N_{мин.} + БАГС (68-е сут) (опыт). Границы бокса с усами — первый и третий квартиль, приведены медианы, максимальные и минимальные значения по выборке (без выбросов).

Достоверность различий, выявленных методом дисперсионного анализа с попарным тестом Тьюки (p-value от 0,05 до 0,0001), показана на рисунке в дополнительных материалах (см. на сайте <http://www.agrobiology.ru>).

Наблюдаемая динамика видового обилия и биоразнообразия по индексу Шеннона для эукариот и прокариот была противоположной (рис. 2). К 30-м сут число ASVs у эукариот по сравнению с исходными значениями снижалось в контроле (спонтанная микрофлора) в 2 раза (со 171 до 78-88), при внесении БАГС — чуть меньше (со 171 до 101-96), далее оставаясь без изменений до конца опыта. Снижение биоразнообразия на ранней стадии разложения растительных остатков по этим показателям отмечали и другие

исследователи (33-35). Напротив, число ASVs бактерий и их биоразнообразие по индексу Шеннона увеличивались к 30-м сут и продолжали нарастать к 68-м сут в обоих вариантах по сравнению с началом опыта. Подобные изменения характерны для более поздних стадий разложения соломы, когда преимущество получают олиготрофные микроорганизмы (33-35). Следовательно, результаты анализа альфа-разнообразия могут служить косвенным свидетельством того, что разложение соломы осуществляют преимущественно грибы, а бактерии развиваются на продуктах трансформации соломы. Поступление с БАГС дополнительного консорциума микроорганизмов увеличило число ASVs в исходной смеси.

Анализ бета-разнообразия (рис. 3) показал, что при разложении соломы наибольшие изменения как эукариотических, так и бактериальных сообществ происходили в течение первых 30 сут как в опыте, так и в контроле. Отметим, что препарат БАГС при внесении сразу существенно повлиял на бактериальные сообщества.

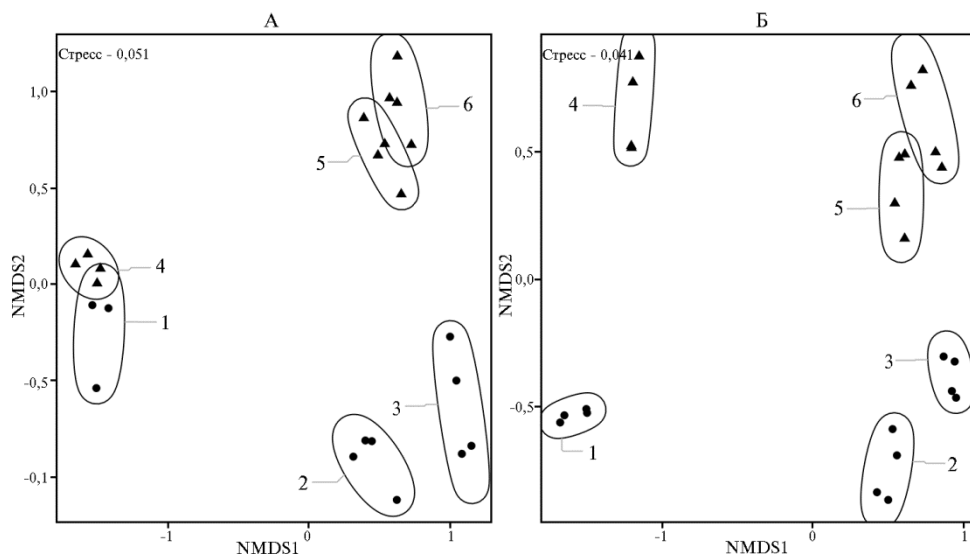


Рис. 3. Бета-разнообразие микробных сообществ эукариот (А) и прокариот (Б) в соломе овса (*Avena sativa* L.) в контроле и при ее обработке БАГС: кружки — контроль, треугольники — обработка БАГС; 1 — солома + $N_{мин.}$ (0-е сут), 2 — солома + $N_{мин.}$ (30-е сут), 3 — солома + $N_{мин.}$ (68-е сут); 4 — солома + $N_{мин.}$ + БАГС (0-е сут), 5 — солома + $N_{мин.}$ + БАГС (30-е сут), 6 — солома + $N_{мин.}$ + БАГС (68-е сут); nonmetric multidimensional scaling (NMDS). Различия между любыми очерченными областями статистически значимы при $p < 0,001$.

2. Состав эукариотического микробиома (%) при разложении соломы овса (*Avena sativa* L.) в контроле и при ее обработке БАГС

| Царство | Таксономическая группа | Контроль | | | БАГС | | |
|----------|----------------------------|----------|--------|--------|-------|--------|--------|
| | | 0 сут | 30 сут | 68 сут | 0 сут | 30 сут | 68 сут |
| Грибы | Отдел <i>Ascomycota</i> | 37,8 | 40,2 | 52,2 | 33,6 | 37,7 | 64,0 |
| | Отдел <i>Basidiomycota</i> | 58,3 | 40,1 | 35,1 | 62,7 | 23,0 | 14,9 |
| Животные | Тип <i>Nematoda</i> | 0 | 17,9 | 4,9 | 0 | 13,9 | 2,0 |
| Растения | Отдел <i>Anthophyta</i> | 3,8 | 0,3 | 0,4 | 3,4 | 0,3 | 0,8 |
| Протисты | Клада <i>Ochrophyta</i> | 0 | 0,9 | 3,9 | 0,1 | 21,4 | 13,1 |

Кроме грибов при таксономической аннотации эукариот были обнаружены другие их представители — растения, животные (нематоды) и протисты (одноклеточные, не входящие в три предыдущих царства) (табл. 2). Из растений в соломе, кроме овса, обнаружили кострец, осоку, мышиный горошек, клевер луговой. По мере разложения соломы доля растений

снижалась. К 30-м сут возрастала относительная представленность свободноживущих нематод-бактериофагов рода *Acrobeloides*, обильно заселяющих почву и подстилку (36). Увеличение числа нематод при no-till отмечалось и в других сообщениях (37). Одним из факторов 3-7-кратного снижения доли нематод к 68-м сут может быть рост обилия хищных грибов рода *Arthrobotrys* (сем. *Orbiliaceae*), которые питаются нематодами. Протисты были представлены охрофитовыми (бледно-желтыми) водорослями, основной вклад в эукариотический микробиом они вносили в варианте с БАГС.

Основную массу эукариот составляли грибы, при этом в исходных субстратах преобладали базидиомицеты (см. табл. 2). Через 30 сут их доля снизилась за счет элиминации в обоих вариантах базидиомицетовых дрожжей (сем. *Bulleribasidiaceae*, *Sporidiobolaceae*), доля которых от грибного микробиома составляла в исходных образцах 21-22 %. К 68-м сут существенно снизилась доля ксерофильных базидиомицетов рода *Wallemia* (с 26-36 до 0,2-1,2 %). К концу эксперимента в соломе численно преобладали аскомицеты, их соотношение с базидиомицетами соответственно для контроля и биопрепарата с 0,65 и 0,54 в начале опыта выросло до 1,49 и 4,30. Аналогичные данные о преобладании аскомицетов на ранней стадии разложения остатков кукурузы (в течение 2 мес) были получены в двухлетнем опыте (32), тогда как к концу эксперимента в субстрате преобладали базидиомицеты и зигомицеты (32)

Мы выявили подавляющее действие БАГС на базидиомицеты: на 68-е сут их доля от суммарного эукариотического микробиома составила 14,9 % (см. табл. 2). В контроле был отмечен значительный рост *Coprinopsis radiata* (навозник радиальный), на 30-е сут его доля составляла 36,1 % от суммы эукариот и 90 % — от базидиомицетов. БАГС снижал развитие *C. radiata* по сравнению с контролем: на 30-е сут — в 2 раза, на 68-е сут — в 11 раз. Таким образом, в варианте с биопрепаратом аскомицеты принимали более активное участие в разложении соломы, чем базидиомицеты. Это могут быть, например *Sordariomycetes*, являющиеся копитрофами: их доля в варианте с БАГС на 68-е сут возросла до 44,8 % от всех грибов.

Грибы, обладающие мощной ферментативной системой, способной разлагать растительные ткани, заслуживают специального внимания, так как многие из них могут вызывать болезни растений (38-40). Суммарная доля родов грибов, включающих фитопатогенные виды (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Waitea*), в варианте с БАГС оказалась довольно значительной — до 20 %. Однако не все представители перечисленных родов фитопатогены, поэтому их присутствие в соломе при разложении нельзя расценивать однозначно негативно. К тому же даже фитопатогенные виды могут вести сапротрофный образ жизни (41).

Доминирующими таксонами бактерий (91-98 % микробиома) были *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Bacillota*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetota*. Прокариотический микробиом мульчи характеризовался отсутствием архей и минорными долями ацидобактерий, в отличие от соломы, разлагавшейся в почве (42). В бактериальном сообществе при деструкции соломы преобладали грамотрицательные бактерии, требующие богатого органического субстрата, которые составляли до 80 % от всего микробиома. По способности утилизировать органический углерод почвы микроорганизмы подразделяют на г-стратегов (копитрофы) и К-стратегов (олиготрофы) (33-35). Условными г-стратегами считают *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Gemmatimonadetes*, к олиготрофам относят *Alpha-* и *Deltaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* и

Acidobacteria (33, 43-45). В контрольной соломе во все сроки отбора проб преобладали г-стратеги, что соответствует ранней стадии деструкции. Для варианта с БАГС было характерно равное соотношение К- и г-стратегов, за исключением преобладания г-стратегов на 30-е сут. Причина, скорее всего, в том, что с функциональной точки зрения в бактериальном сообществе БАГС К-стратеги преобладали над г-стратегами (превышение в 2,1 раза).

3. Таксономический состав прокариотического микробиома (% от суммарного микробиома) в соломе овса (*Avena sativa* L.) в контроле и при ее обработке БАГС

| Филум | Семейство | Солома + N _{мин.} | | | Солома + N _{мин.} + БАГС | | | |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------|---------|-----------------------------------|---------|--------|--------|
| | | 0 сут | 30 сут | 68 сут | 0 сут | 30 сут | 68 сут | |
| <i>Actinobacteriota</i> | <i>Microbacteriaceae</i> | ↓ 13,28 | ↓ 2,68 | ↓ 2,66 | 9,44 | ↓ 2,27 | ↓ 2,37 | |
| | <i>Streptosporangiaceae</i> | 0 | ↑ 3,99 | ↑ 3,28 | 0,05 | ↑ 4,83 | ↑ 3,62 | |
| | <i>Solirubrobacteraceae</i> | 0 | ↑ 1,65 | ↑ 1,69 | 0,01 | ↑ 4,34 | ↑ 2,92 | |
| <i>Bacillota</i> | <i>Bacillaceae</i> | 0 | 0,24 | 0,61 | 0,15 | ↑ 2,17 | ↑ 2,14 | |
| | <i>Paenibacillaceae</i> | 0,30 | ↑ 1,70 | ↑ 1,89 | 0,17 | ↑ 0,82 | ↑ 0,70 | |
| | <i>Staphylococcaceae</i> | 8,68 | ↓ 0,03 | ↓ 0,08 | 0,25 | 0,09 | 0 | |
| <i>Bacteroidota</i> | <i>Chitinophagaceae</i> | 0 | ↑ 5,47 | ↑ 6,81 | 0,54 | ↑ 6,90 | ↑ 4,95 | |
| | <i>Hymenobacteraceae</i> | 4,57 | ↓ 0 | ↓ 0 | 4,04 | ↓ 0 | ↓ 0 | |
| | <i>Microscillaceae</i> | 0 | 0,17 | ↑ 1,06 | 0,01 | ↑ 1,68 | ↑ 4,11 | |
| | <i>Sphingobacteriaceae</i> | 2,82 | ↑ 4,78 | 3,22 | 5,69 | ↓ 1,74 | ↓ 0,61 | |
| | <i>Polyangiaceae</i> | 0 | 0,04 | ↑ 1,64 | 0 | 0,05 | ↑ 2,57 | |
| <i>Mycococcota</i> | <i>Rubinisphaeraceae</i> | 0 | ↑ 1,89 | 0,76 | 0 | 0,82 | 0,32 | |
| <i>Planctomycetota</i> | <i>Caulobacteraceae</i> | 0,03 | ↑ 3,35 | ↑ 2,36 | 0,01 | ↑ 2,66 | ↑ 1,44 | |
| | <i>Beijerinckiaceae</i> | 1,67 | ↓ 0,57 | 0,18 | 0,46 | 0,49 | 0,24 | |
| | <i>Devosiaceae</i> | 0,01 | ↑ 2,58 | ↑ 2,6 | 0,04 | ↑ 5,1 | ↑ 3,61 | |
| | <i>Rhizobiaceae</i> | 2,21 | ↑ 6,38 | 1,88 | 2,09 | ↑ 5,2 | ↑ 4,07 | |
| | <i>Sphingomonadaceae</i> | 25,68 | ↓ 3,43 | ↓ 1,72 | 25,35 | ↓ 2,64 | ↓ 2,00 | |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Alcaligenaceae</i> | 0 | 0,87 | ↑ 1,17 | 0 | ↑ 1,04 | 0,40 | |
| | <i>Burkholderiaceae</i> | 0 | 0,12 | 0,37 | 0,11 | ↑ 1,71 | ↑ 1,61 | |
| | <i>Comamonadaceae</i> | 0,8 | 1,07 | ↑ 2,56 | 0,53 | ↑ 3,41 | ↑ 4,37 | |
| | <i>Enterobacteriaceae</i> | 0,65 | 0,95 | 0,08 | 0,09 | 0,28 | 0,15 | |
| | <i>Erwiniaceae</i> | 4,44 | ↓ 0,36 | ↓ 0,33 | 2,79 | ↓ 0,52 | ↓ 0,26 | |
| | <i>Cellvibrionaceae</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,35 | ↑ 1,77 | |
| | <i>Pseudomonadaceae</i> | 15,79 | 11,34 | ↓ 5,79 | 11,13 | ↓ 3,60 | ↓ 1,95 | |
| | <i>Steroidobacteraceae</i> | 0 | ↑ 1,19 | ↑ 3,36 | 0,12 | ↑ 1,39 | ↑ 3,50 | |
| | <i>Xanthomonadaceae</i> | 1,33 | ↑ 6,15 | ↑ 3,65 | 1,16 | ↑ 13,33 | ↑ 8,01 | |
| | <i>Verrucomicrobiota</i> | <i>Rubritaleaceae</i> | 0 | ↑ 2,81 | ↑ 1,71 | 0 | ↑ 2,63 | ↑ 0,97 |
| | | <i>Verrucomicrobiaceae</i> | 0 | 0,37 | 0,91 | 0 | 0,22 | 0,14 |
| Remaining taxa (2477 ASVs) | | 6,1 | ↑ 23,38 | ↑ 31,86 | 21,45 | 19,64 | 25,1 | |

Примечание. Стрелками отмечено повышение (↑) или снижения (↓) представленности семейства по мере деструкции соломы (по сравнению с 0 сут).

Таксономический состав прокариот, как и эукариот, значительно изменялся во времени: 58,3-58,7 % исходного микробиома прокариот исчезла, или их доля снизилась к 68-м сут (табл. 3).

Доля семейств *Microbacteriaceae*, *Hymenobacteraceae*, *Beijerinckiaceae*, *Sphingomonadaceae* и *Erwiniaceae*, значительно представленных в сообществе соломы в начале эксперимента, снизилась в 4-15 раз к 68-м сут. Доля *Streptosporangiaceae*, *Solirubrobacteraceae*, *Chitinophagaceae*, *Microscillaceae*, *Polyangiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Devosiaceae*, *Comamonadaceae*, *Steroidobacteraceae*, *Xanthomonadaceae*, *Rubritaleaceae*, напротив, увеличивалась со временем. По известным данным анализа таксономического состава БАГС, основные компоненты бактериального сообщества препарата относились к представителям фил *Pseudomonadota*, *Planctomycetota* и *Bacteroidota*, а грибного — к представителям классов *Sordariomycetes*, *Mucoromycetes* и *Leotiomyces* (15). Под влиянием БАГС доля семейств *Cellvibrionaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Solirubrobacteraceae* увеличилась, а на уровне фил возросла представленность *Bacteroidota* по сравнению с *Bacillota*; в целом олиготрофность бактериального сообщества повышалась.

Наибольшие изменения в составе микробиомов происходили в течение первых 30 сут. В процессе разложения рисовой соломы (45) основной причиной смены бактериальных сообществ было более быстрое исчерпание наиболее доступных органических субстратов, что мы наблюдали и в нашем эксперименте при внесении биопрепарата. Поэтому меньшие различия микробных сообществ с 30-х по 68-е сут при внесении биопрепарата могут быть связаны с тем, что в варианте с БАГС первая стадия разложения соломы заканчивалась быстрее, возможно, к 30-м сут. Стоит учесть и преобладание олиготрофной микрофлоры в биопрепарате (15). Причиной может быть то, что численность как бактерий, так и грибов при внесении биопрепарата существенно не изменялась. Ряд исследователей показали, что со скоростью разложения растительных остатков коррелирует численность, а не разнообразие микробиоты (32, 34, 35). Вероятно, видовое богатство и разнообразие микроорганизмов не относятся к существенным факторам биотрансформации из-за функциональной избыточности микробных сообществ при разложении растительных остатков, когда многие микроорганизмы со сходными функциями занимают одну и ту же нишу (35). Кроме того, следует учесть небольшую длительность эксперимента — около 2 мес, в течение которых до 70 % массы соломы еще не разложилось. Учитывая положительную тенденцию к увеличению скорости разложения соломы и принимая во внимание потенциал БАГС в деградации ксенобиотиков (14), следует провести более длительные эксперименты, возможно с увеличением количества добавленного минерального азота. Еще одной задачей остается установление роли протистов в процессах деструкции соломы. По нашим данным, их относительная представленность в варианте с БАГС существенно (в 4–10 раз) возросла.

Таким образом, впервые проведенное глубокое секвенирование ампликонных библиотек гена 16S рРНК и ITS микробиомов соломы овса при разложении на поверхности почвы (мульча) показало значительное изменение сукцессии и состава прокариотической и эукариотической компоненты под влиянием биопрепарата БАГС. Выявлено, что около 60 % исходных про- и эукариотического микробиомов не принимали значимого участия в процессе деструкции и были заменены другими микроорганизмами. Биопрепарат БАГС, имея сложную таксономическую структуру со значительной долей некультивируемых, но функционально важных участников, наиболее существенно повлиял на состав и динамику эукариотического микробиома. Можно отметить быстрое подавление базидиомицетов в присутствии БАГС, например уменьшение доли *Coprinopsis radiata* (навозник радиальный) на 30-е сут в 2 раза, а на 68-е сут — в 11 раз по сравнению со спонтанным микробиомом в контроле. Однако данные анализа состава микробиома методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и оценки альфа-разнообразия дают основания полагать, что в нашем эксперименте именно грибы играли основную роль в разложении соломы. В присутствии БАГС такими грибами могут быть аскомицеты *Sordariomycetes*, проявляющие копитрофные свойства. Показано, что существенные различия по таксономическому составу микробных сообществ контрольного (без БАГС) и опытного (с добавлением БАГС) вариантов практически не влияли на эффективность разложения соломы. В условиях краткосрочного эксперимента в присутствии минерального азота биопрепарат БАГС практически не ускорил деструкцию соломы, несмотря на повышение активности микроорганизмов на 30-е сут (увеличение продукции CO₂ на 44 %, снижение содержания в соломе водорастворимых органических соединений и нитратного азота в 1,6 и 1,8 раза).

DYNAMICS OF THE PRO- AND EUKARYOTIC MICROBIOME OF STRAW DURING ITS DESTRUCTION UNDER SURFACE APPLICATION

O.V. Orlova✉, G.V. Gladkov, A.O. Zverev, V.M. Shapkin, T.O. Lisina, N. Kurchak,
A.A. Kichko, I.A. Arkhipchenko, E.E. Andronov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail falenki@hotmail.com (✉ corresponding author), grgladkov@arriam.ru, azver.bio@gmail.com, vasyashappa@gmail.com, lisina-to@yandex.ru, nick.kurchak@gmail.com, 2014arki@gmail.com, arkhichenkoirina@mail.ru, eandr@gmail.com
ORCID:

Orlova O.V. orcid.org/0000-0002-2154-503X

Gladkov G.V. orcid.org/0000-0002-5489-1414

Zverev A.O. orcid.org/0000-0002-5315-8632

Shapkin V.M. orcid.org/0000-0002-8394-3009

Lisina T.O. orcid.org/0000-0003-1268-4166

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Performed using equipment of the Core Centrum Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology, ARRIAM

Funded by the Russian Science Foundation, grant No. 23-16-00147

Final revision received July 30, 2024

Accepted September 22, 2024

Kurchak N. orcid.org/0009-0009-5901-0354

Kichko A.A. orcid.org/0000-0002-8482-6226

Arkhipchenko I.A. orcid.org/0009-0003-6312-7666

Andronov E.E. orcid.org/0000-0002-5204-262X

doi: 10.15389/agrobiology.2025.1.82eng

Abstract

No-till technologies are becoming more widespread, as they allow for obtaining high yields at lower costs while reducing soil degradation (G.A. Thomas et al., 2007). One of the key issues in no-till farming is the regulation of the quantity and quality of mulch. No-till requires the use of herbicides and pesticides, which increases the risk of accumulating their residual amounts in mulch. The BAGS biopreparation developed at the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology is capable of decomposing prometryn and possessing high cellulolytic activity. In this work, a significant change in the succession and composition of straw microbiomes under the influence of BAGS was shown for the first time; however, despite the increase in the activity of microorganisms, no significant increase in the efficiency of destruction in the variant with the biological preparation was detected over 68 days. The aim of the work was to study the dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbiomes of straw when its decomposition occurs on the soil surface in the presence of BAGS. A laboratory experiment with composting oat straw (*Avena sativa* L.) on the soil surface was carried out in 1-liter plastic containers. Nylon fabric was laid on the soil surface, onto which 15 g of chopped straw was placed. The straw was pre-soaked for 2 h in an NH_4NO_3 solution at the rate of 5 g N/kg of straw. Straw without treatment with BAGS served as a control. In the experimental variant, 10 % BAGS was added to wet straw. At the beginning of the experiment (day 0) and in 30 and 68 days, the number of fungi and bacteria in the straw were determined using real-time PCR (RT-PCR), along with straw mass loss, nitrate content, water-soluble carbon, ash content, and respiration. Prokaryotic and eukaryotic microbial communities of straw were analyzed using deep sequencing of the 16S rRNA gene (prokaryotes) and ITS (eukaryotes) amplicon libraries. Oat straw decomposed quickly, on day 30, the mass loss was 31–35 %. The introduction of BAGS increased the emission of carbon dioxide on day 30 (569 ± 36 vs 394 ± 67 mg $\text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ in the control), and on day 68, the difference was 8 %. The high activity of microorganisms led to greater consumption of readily available nutrients by them, which was evident from the decrease in the amount of water-soluble organic compounds by 1.6–1.8 times and nitrate nitrogen by 1.8–1.4 times vs the control. Probably, under the experimental conditions, the lack of mineral nitrogen was one of the factors contributing to the low efficiency of BAGS as a straw decomposer compared to the control: on day 68, the ash content was 11.6 % higher, and the loss of straw mass was 5 %. Recalculation of the absolute copy numbers of the 16S rRNA gene and ITS (RT-PCR) into the cell number showed that during straw destruction the number of bacteria exceeded the number of fungi by 3.6–4.1 times. However, if we take into account the difference in the mass and volume of prokaryotic and eukaryotic cells, the biomass of fungi can exceed bacterial biomass by hundreds times, up to 500-fold. Analysis of alpha diversity for fungi revealed a classic succession pattern, namely low Shannon index and a smaller number of species at the beginning of the experiment, followed by a subsequent growth of biodiversity, which can serve as indirect confirmation of the leading role of fungi

in the straw destruction. It was shown that up to 60 % of the representatives of the initial prokaryotic and eukaryotic communities of straw did not play a significant role in its decomposition and were replaced by other microorganisms. The greatest changes in the composition of microbiomes occurred during the first 30 days, with small differences between days 30 and 68. During the analysis of eukaryotes (ITS), along with fungi, other representatives were identified, in particular plants, nematodes, and protists. Nematodes and protists appearing in the straw biotransformation occupied a noticeable place in the microbiome, up to 17.9 % and 21.4 %, respectively. The biopreparation BAGS had a significant effect on the eukaryotic community. The relative representation of protists increased by 4-10 times compared to the control, while the role of basidiomycetes decreased. On day 68, the ratio of ascomycetes and basidiomycetes was 1.49 and 4.30, respectively. The proportion of *Coprinopsis radiata* decreased 2-fold on day 30 and 11-fold on day 68. BAGS had little effect on the number of microorganisms and the rate of straw destruction over 68 days of our experiment. However, it was found that under its influence, the structure of prokaryotic and eukaryotic microbial communities and their succession changed significantly. Conditions for increasing the efficiency of BAGS application, given its potential for pesticide degradation, we plan to investigate in more details in further experiments.

Keywords: mulch, BAGS, 16S rRNA gene, ITS, real-time PCR, qPCR, high-performance sequencing, destruction of oat straw, succession of microbial communities.

REFERENCES

1. Thomas G.A., Titmarsh G.W., Freebairn D.M., Radford B.J. No-tillage and conservation farming practices in grain growing areas of Queensland — a review of 40 years of development. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2007, 47(8): 887-898 (doi: 10.1071/EA06204).
2. Kassam A., Friedrich T., Derpsch R. Global spread of conservation agriculture. *International Journal of Environmental Studies*, 2019, 76(1): 29-51 (doi: 10.1080/00207233.2018.1494927).
3. Peixoto D.S., da Silva L.D.C.M., de Melo L.B.B., Azevedo R.P., Araujo B.C.L., de Carvalho T.S., Moreira S.G., Curi N., Silva B.M. Occasional tillage in no-tillage systems: a global meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 2020, 745: 140887 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140887).
4. Vizioli B., Cavalieri-Polizeli K.M.V., Tormena C.A., Barth G. Effects of long-term tillage systems on soil physical quality and crop yield in a Brazilian Ferralisol. *Soil and Tillage Research*, 2021, 209: 104935 (doi: 10.1016/j.still.2021.104935).
5. Conyers M., van der Rijt V., Oates A., Poile G., Kirkegaard J., Kirkby C. The strategic use of minimum tillage within conservation agriculture in southern New South Wales, Australia. *Soil and Tillage Research*, 2019, 193: 17-26 (doi: 10.1016/j.still.2019.05.021).
6. Dridiger V.K., Ivanov A.L., Belobrov V.P., Kutovaya O.V. *Pochvovedenie*, 2020, 9: 1111-1120 (doi: 10.31857/S0032180X20090038) (in Russ.).
7. Pykhtin I.G. *Zemledelie*, 2017, 1: 33-36 (in Russ.).
8. Dang Y.P., Moody P.W., Bell M.J., Seymour N.P., Dalal R.C., Freebairn D.M., Walker S.R. Strategic tillage in no-till farming systems in Australia's northern grains-growing regions: II. Implications for agronomy, soil and environment. *Soil and Tillage Research*, 2015, 152: 115-123 (doi: 10.1016/j.still.2014.12.013).
9. Du Z., Angers D.A., Ren T., Zhang Q., Li G. The effect of no-till on organic C storage in Chinese soils should not be overemphasized: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2017, 236: 1-11 (doi: 10.1016/j.agee.2016.11.007).
10. Rusakova I.V. *Juvenis scientia*, 2018, 9: 4-9 (doi: 10.32415/jscientia.2018.09.01) (in Russ.).
11. Tarasov S.A., Shershneva O.M. *Vestnik Kurskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*, 2014, 6: 41-45 (in Russ.).
12. Shcherbakov A.V., Rusakova I.V., Orlova O.V., Vorobyov N.I., Sviridova O.V., Shcherbakova E.N., Chebotar V.K. Aerobic cellulolytic community associated with *Sphagnum fallax* as a base for crop residues destruction processes. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2014, 1: 54-62 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.1.54rus).
13. Chauhan B.S., Singh R.G., Mahajan G. Ecology and management of weeds under conservation agriculture: a review. *Crop Protection*, 2012, 38: 57-65 (doi: 10.1016/j.cropro.2012.03.010).
14. Kruglov Yu.V., Paromenskaya L.N. Microbiological factors of self-purification and bioremediation of soil polluted by herbicide prometryne. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 3: 76-80 (in Russ.).
15. Lisina T.O., Zverev A.O., Gladkov G.V., Kimeklis A.K., Orlova O.V., Kichko A.A., Andronov E.E. Metagenomic analysis of pro- and eukaryotic components of microbiota of biologically active preparation BAGS. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2025, 60(1): 96-109 (doi: 10.15389/agrobiology.2025.1.96rus).
16. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(supplement_1): 4516-4522 (doi: 10.1073/pnas.1000080107).

17. Op De Beeck M., Lievens B., Busschaert P., Declerck S., Vangronsveld J., Colpaert J.V. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e97629 (doi: 10.1371/journal.pone.0097629).
18. Kichko A.A., Gladkov G.V., Ulianich P.S., Safronova V.I., Pinaev A.G., Sekste E.A., Belimov A.A., Andronov E.E. Water stress, cadmium, and plant genotype modulate the rhizosphere microbiome of *Pisum sativum* L. *Plants*, 2022, 11(22): 3013 (doi: 10.3390/plants11223013).
19. 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, 13(7): 581-583 (doi: 10.1038/nmeth.3869).
20. McMurdie P. J., Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e61217 (doi: 10.1371/journal.pone.0061217).
21. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 2012, 41(D1): D590-D596 (doi: 10.1093/nar/gks1219).
22. Nilsson R.H., Larsson K.H., Taylor A.F.S., Bengtsson-Palme J., Jeppesen T.S., Schigel D., Kennedy P., Picard K., Glöckner F.O., Tedersoo L., Saar I., Kõljalg U., Abarenkov K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D259-D264 (doi: 10.1093/nar/gky1022).
23. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D.A., François R., Grolemond G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 2019, 4(43): 1686 (doi: 10.21105/joss.01686).
24. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.). John Wiley and Sons, N.Y., 1991.
25. Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 4117-4120 (doi: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005).
26. Lavrinienko A., Jernfors T., Koskimäki J.J., Pirttilä A.M., Watts P.C. Does intraspecific variation in rDNA copy number affect analysis of microbial communities? *Trends in Microbiology*, 2021, 29(1): 19-27 (doi: 10.1016/j.tim.2020.05.019).
27. *Spravochnik po analizu organicheskikh udobreniy* /Pod redaktsiey A.I. Es'kova [Handbook of organic fertilizer analysis. A.I. Es'kov (ed.)]. Moscow, 2000 (in Russ.).
28. Sharkov I.N. *Pochvovedenie*, 1987, 10: 153-157 (in Russ.).
29. Panikov N.S., Gorbenko A.Yu., Svetlov S.V. *Sposob opredeleniya summarnogo sodержaniya vodorastvorimyykh organicheskikh veshchestv v pochve. Patent № 1318909 (SSSR) MKP G 01 N 33/24. MGU im. M.V. Lomonosova (SSSR). № 3949440/30-15. Zayavl.06.09.85. Opubl. 23.06.87. Byul. № 23* [Method for determining the total content of water-soluble organic matter in soil. Patent No. 1318909 (USSR) IPC G 01 N 33/24. Lomonosov Moscow State University (USSR). No. 3949440/30-15. Claimed 06.09.85. Publ. 23.06.87. Bull. No. 23] (in Russ.).
30. Kozhevnikov P.A., Polyanskaya L.M., Zvyagintsev D.G.. *Mikrobiologiya*, 1979, 48(4): 490-494 (in Russ.).
31. Polyanskaya L.M., Geydebekht V.V., Stepanov A.L., Zvyagintsev D.G. *Pochvovedenie*, 1995, 3: 322-328 (in Russ.).
32. Zhao S., Fan F., Qiu S., Xu X., He P., Ciampitti I.A. Dynamic of fungal community composition during maize residue decomposition process in north-central China. *Applied Soil Ecology*, 2021, 167: 104057 (doi: 10.1016/j.apsoil.2021.104057).
33. Fierer N., Bradford M.A., Jackson R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364 (doi: 10.1890/05-1839).
34. Sanaullah M., Chabbi A., Maron P.A., Baumann K., Tardy V., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y., Rumpel, C. How do microbial communities in top-and subsoil respond to root litter addition under field conditions? *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 103: 28-38 (doi: 10.1016/j.soilbio.2016.07.017).
35. Herzog C., Hartmann M., Frey B., Stierli B., Rumpel C., Buchmann N., Brunner, I. Microbial succession on decomposing root litter in a drought-prone Scots pine forest. *The ISME Journal*, 2019, 13(9): 2346-2362 (doi: 10.1038/s41396-019-0436-6).
36. Andrassy I. *Free-living nematodes of Hungary (Nematoda errantia). Part I*. Budapest, 2005.
37. Yeates G.W., Hughes K.A. Effect of three tillages regimes on plant and soil nematodes in an oats/maize rotation. *Pedobiologia*, 1990, 34(6): 379-387 (doi: 10.1016/S0031-4056(24)00037-4).
38. Peng Y., Li S.J., Yan J., Tang Y., Cheng J.P., Gao A.J., Yao X., Ruan J.J., Xu B.L. Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 670135 (doi: 10.3389/fmicb.2021.670135).
39. Diakite S., Polyakov A.V., Stakheev A.A., Alekseeva T.V., Zavriev S.K., Said R.R. Species composition of fungi of the genus *Fusarium* Link on garlic plants in Moscow region. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, 57(1): 151-157 (doi: 10.15389/agrobiologiya.2022.1.151rus).

40. Trenochnikova L.P., Balgimbaeva A.S., Ultanbekova G.D., Galimbaeva R.Sh. Antifungal activity against pathogens of cereals and characterization of antibiotics of *Streptomyces* sp. strain K-541 isolated from extreme ecosystems in Kazakhstan. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(1): 96-102 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.96rus).
41. Strunnikova O., Vishnevskaya N., Shakhnazarova V., Lentsman N. Development of two strains of *Fusarium culmorum* with a different aggressiveness in the soil and on the roots of barley of two genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 151: 579-592 (doi: 10.1007/s10658-017-1396-1).
42. Orlova O.V., Kichko A.A., Pershina E.V., Pinaev A.G., Andronov E.E. *Pochvovedenie*, 2020, 11: 1383-1392 (doi: 10.31857/S0032180X20090117) (in Russ.).
43. Li H., Yan, S., Semenov M. V., Yao F., Ye J., Bu R., Kuzyako, Y. Temperature sensitivity of SOM decomposition is linked with a K-selected microbial community. *Global Change Biol.*, 2021, 27(12): 2763-2779 (doi: 10.1111/gcb.15593).
44. Wickings K., Grandy A.S., Reed S.C., Cleveland C.C. The origin of litter chemical complexity during decomposition. *Ecology Letters*, 2012, 15(10): 1180-1188 (doi: 10.1111/j.1461-0248.2012.01837.x).
45. Wang X., He P., Xu X., Qiu S., Zhao S. Characteristics of rice straw decomposition and bacterial community succession for 2 consecutive years in a paddy field in southeastern China. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 20893 (doi: 10.1038/s41598-022-25229-8).