

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.033

ВЛИЯНИЕ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE) НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И МИКРОБИОМ ПОЧВЫ ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ФАСОЛИ

А.А. Кублановская¹, С.А. Хапчаева², В.С. Зотов², П.А. Зайцев¹, Е.С. Лобакова¹,
А.Е. Соловченко^{1,*}

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²ФИЦ «Биотехнологии РАН», Российская академия наук, Россия, 119071,
г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

В настоящее время остро стоит проблема дефицита сырья для химических фосфорных удобрений и снижения неблагоприятного воздействия их использования на окружающую среду. К перспективным направлениям ее решения относится использование биоудобрений из обогащенной фосфором суспензии клеток (биомассы) микроводорослей, однако многие фундаментальные аспекты влияния таких удобрений на биологическую активность и микробиом почв остаются неизвестными. Исследовали влияние биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) на биологическую активность, эффективность ризобияльных и цианобактериальных биопрепаратов, а также на микробиом почвы при возделывании фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта «Стрела», а также на общую и удельную урожайность этой культуры. Для почвы из ризосферы растения определяли актуальную азотфиксацию и денитрификацию, эмиссию двуокиси углерода и метана. Таксономическую структуру прокариотного сообщества почвы из ризосферы фасоли определяли методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов фрагмента гена 16S рРНК на платформе Illumina. Метагеномные данные анализировали с помощью программных инструментов QIIME и VAMPS. Установили, что использование суспензии клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 в качестве фосфорного биоудобрения не оказывает негативного влияния на биологическую активность почвы, не повышает уровень денитрификации и не вызывает значительного роста эмиссии «парниковых газов». При этом внесение биомассы хлореллы повышало уровень азотфиксации, но не снижало урожайность и не ослабляло действия ростостимулирующих биопрепаратов на основе ризобий и цианобактерий. Также не выявлено значительных изменений таксономического состава прокариот почвы из ризосферы. В целом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии негативного влияния внесения биомассы хлореллы на биологическую активность и микробиом почвы под фасолью. Как следствие, исследование показало принципиальную возможность замены химических удобрений фосфорными биоудобрениями из биомассы микроводорослей.

Ключевые слова: биоудобрения, микробиом, метагеном, микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, фосфорное питание

Высокая урожайность в современных технологиях возделывания культурных растений достигается внесением высоких количеств минеральных удобрений, включая фосфорные. Фосфорные удобрения производятся из невозобновляемого минерального сырья, а само производство наносит значительный вред окру-

жающей среде [1]. Существенный недостаток традиционных (химических) удобрений — низкая доступность внесенного с ними фосфора для растений и быстрое вымывание его из почвы. Попадая в водоемы, биодоступный фосфор вызывает эвтрофикацию, «цветение» микроводорослей, в том числе токсичных [2, 3]. Парадигма

безотходной биоэкономики (circular bioeconomy) предписывает переход на использование биоудобрений. Одним из наиболее перспективных видов биоудобрений является обогащенная фосфором биомасса микроводорослей, выращенных на сточных водах [2]. Этот подход обеспечивает, с одной стороны, комплексное решение проблемы эффективной биологической очистки сточных вод, а с другой — экономичное использование невозобновляемых ресурсов фосфора.

Использование биомассы микроводорослей в качестве удобрения обладает целым рядом преимуществ. Скорость освобождения биодоступного фосфора из клеток микроводорослей ближе к скорости его поглощения растениями, что повышает полноту усвоения вносимого фосфора, а также снижает его непродуктивные потери и риск эвтрофикации [4]. Принципиальная возможность использования биомассы микроводорослей как источника фосфора, сравнимого по эффективности с традиционными удобрениями, была показана для культурных растений в защищенном и открытом грунте [4, 5].

Производство пролонгированных химических удобрений, обеспечивающих те же эффекты, обходится дороже получения биомассы микроводорослей. Кроме того, биомасса микроводорослей, в отличие от химических удобрений, не требует заделки в почву, дополнительно снижая затраты труда и иных ресурсов при возделывании культурных растений [3]. Не менее важен положительный эффект, связанный с улучшением структуры почвы и повышением содержания органического углерода после внесения биомассы микроводорослей.

Несмотря на благоприятные перспективы, широкое применение микроводорослей в качестве удобрений сдерживается недостатком фундаментальных знаний о влиянии внесения значительных количеств живых клеток микроводорослей на ключевые характеристики почвы. К важнейшим параметрам относятся биоразнообразие почвенного микробиома и биологическая активность почвы. В настоящей статье представлены результаты анализа влияния предпосевной обработки семян и внесения биомассы зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 под растения фасолы на биологическую активность ризосферной почвы и таксономический состав ее микробиома.

Материалы и методы

Растительные объекты и условия выращивания. Эксперименты проводили на семенах и растениях фасоли (*Phaseolus vulgaris* L., сорт «Стрела»). Для обработки семян использовали

биомассу (суспензию живых клеток плотностью $40 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ по сухому весу в водопроводной воде) одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, выращенную, как описано ранее [6]. Анализировали влияние предпосевной обработки семян и внесения биомассы *C. vulgaris* на всхожесть, урожайность и биологическую активность почвы. Дополнительно исследовали влияние биопрепаратов «Ризобифит» (препарат на основе клубеньковых бактерий), «Циано-бактериальный консорциум» (ЦБК, состоит из культур цианобактерий *Nostoc* и клубеньковых бактерий) и «Микробный полифункциональный консорциум» (МПК; препарат на основе ризобийных штаммов, культур *Bacillus* sp. и *Lelliotia* sp.), описание приводится на сайте производителя (<https://niishk.ru/innovacionnaya-produkciya/mik/>). Почва — дерново-подзолистая, предшественник — чистый пар без внесения удобрений. Подготовка почвы: ранневесенняя перекопка вручную на глубину 16–20 см, после подсыхания почвы — рыхление почвы на глубину 25–27 см. Посадку фасоли осуществляли 6 мая 2018 г.; высаживали по 100 семян в ряд в каждом из экспериментальных вариантов. При посадке семена обрабатывали суспензией микроводорослей и (или) биопрепарата (сухой вес клеток микроводорослей в суспензии — 2% от массы семян). При посадке также вносили биомассу микроводорослей (содержание фосфора — 6% от сухого веса клеток по измерениям методом ICP-MS [7]) либо (в контроле) суперфосфат в дозе, эквивалентной по содержанию фосфора таковому, внесенному с биомассой микроводорослей ($0,8 \text{ г фосфора} \cdot \text{м}^{-2}$ [8]). После посадки проводили мероприятия по уходу за растениями.

Уборку фасоли осуществляли после пожелтения и подсыхания бобов. Учет вели путем уборки бобов вручную с последующим взвешиванием. Для определения биологической активности почвы использовали образцы свежей почвы из ризосферы, отобранные стерильным инструментом в стерильные контейнеры в фазу полной зрелости, перед уборкой урожая. Отсутствие клубеньков фасоли в образцах почвы контролировали визуально. Контроль — вариант без обработки биопрепаратами. Достоверность различия средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Для определения актуальной нитрификации (нитрогеназной активности) отбирали навески почвы (5 г) без клубеньков. Образцы почвы помещали в пенициллиновые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и шприцем вводили 1 мл ацетилена. Флаконы инкубировали в термостате (1 ч при 25°C), после чего шпри-

цем отбирали 1 мл газовой фазы и анализировали на газовом хроматографе «Кристалл-2000» с детектором электронного захвата и набивной колонкой (1 м × 3 мм; Porapak N 80/100). Температуры: колонка — 60 °С, детектор — 160 °С, испаритель — 100 °С; расход газа-носителя (N₂) — 50 мл·мин⁻¹, воздуха — 280 мл·мин⁻¹, водорода — 28 мл·мин⁻¹. Все анализы биоактивности почвы проводили в пятикратной повторности.

Для определения актуальной денитрификации навеску свежей почвы (5 г) помещали в пенициллиновые флаконы. Герметично закрывали резиновыми пробками и в течение 1 мин продували аргоном, вводили 1 мл ацетилена и инкубировали (1 ч при 25 °С). Измерение концентрации N₂O проводили на третьи-пятые сутки на газовом хроматографе «Кристалл-2000» с теми же детектором и колонкой. Температуры: колонка — 50 °С, детектор — 240 °С, испаритель — 100 °С; расход газа-носителя — 90 мл·мин⁻¹.

Для определения актуальной эмиссии CO₂ навеску свежей почвы (5 г) помещали в пенициллиновые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и инкубировали (24 ч при 25 °С). Продукцию CO₂ определяли на газовом хроматографе М-3700 с детектором по теплопроводности и набивной колонкой (3 м × 3 мм), наполнитель — Полисорб-1; температуры: испаритель — 30 °С, детектор — 100 °С; измерительные элементы — 150 °С; сила тока 148 мА, расход газа-носителя (гелия) — 30 мл·мин⁻¹.

Для определения эмиссии метана навески почвы (5 г), просеянной через сито (ячейки 1 мм), помещали в пенициллиновые флаконы, увлажняли стерильной водой до влажности 60% от полной влагоемкости. Флаконы укупоривали резиновой пробкой и помещали в термостат при температуре 25 °С на 7 сут. Затем из флаконов отбирали пробу (1 мл) и на хроматографе «Кристалл-2000» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) определяли количество образовавшегося метана.

ДНК для метагеномного анализа выделяли из навески свежей стерильно отобранной почвы массой 0,25 г с помощью набора реактивов PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., США) по протоколу производителя. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК с гипервариабельным участком V4 и приготовление библиотек для секвенирования осуществляли, как описано ранее [9] с использованием олигонуклеотидных праймеров F515 (5'-gtgccagcmgcccggtaa-3') и R806 (5'-ggactacvsgggtatcta-3') [10]. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeq 500

cycles v. 2 kit (part number MS-102-2003, Illumina, США) для парного-концевого чтения (2 × 250 п.н.).

Первичную обработку данных (сортировку ампликонов, оценку качества полученных последовательностей, а также удаление химерных последовательностей и последовательностей неудовлетворительного качества) осуществляли в программе QIIME v 1.9.1 [11]. В рассмотрение принимались лишь последовательности с длиной 200–500 нуклеотидов. Дальнейшую обработку данных, а именно оценку таксономического состава и β-разнообразия (сравнение образцов между собой), проводили при помощи онлайн-сервиса VAMPS [12]. В качестве базы референсных последовательностей использовали базу данных Silva, версия 119 от 24.07.2014 [13]. Для сравнения прокариотических сообществ для каждой пары образцов на основании принадлежности последовательностей к различным родам бактерий и архей рассчитывали индекс сходства Мориситы-Хорна [14]. Элементы полученной матрицы сходства использовали для анализа методом главных компонент (три компоненты).

Результаты и обсуждение

Сопоставление урожайности фасоли сорта «Стрела» в проведенных экспериментах выявило значительную прибавку в общей урожайности (785,5±30 г против 341±25 г в контроле), главным образом за счет 2–3-кратного повышения всхожести семян. Достоверных различий по удельной урожайности (в расчете на одно растение) выявлено не было. Внесение биомассы хлореллы и биопрепарата МПК давало дополнительное повышение общей урожайности (924±45 г) по сравнению с обработкой только биомассой хлореллы. Обработка семян только исследованными биопрепаратами без внесения биомассы микроводорослей (см. раздел «Материалы и методы») не оказывала влияния на всхожесть и урожайность, сравнимого с таковым при внесении биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1. Таким образом, замена традиционных (химических) фосфорных удобрений биомассой хлореллы при эквивалентных дозах внесения (0,8 г Р/м²) в наших экспериментальных условиях не вызывала снижения урожайности в расчете на одно растение, а общая урожайность повышалась на 30% (в варианте с дополнительной обработкой семян биопрепаратом МПК — на 70%).

Возможность применения удобрений и биопрепаратов, а также их эффективность определяется не только повышением урожайности, но и влиянием вносимых удобрений на свойства почвы, в частности, на ее микробиологическую

активность. В этой связи было исследовано влияние внесения биомассы хлореллы и обработки биопрепаратами МПК, ЦБК и «Ризобифит» на ключевые параметры микробиологической активности почвы. Важной характеристикой состояния почвы является активность азотфиксирующих микроорганизмов, повышающих содержание биодоступного химически связанного азота. Установлено, что внесение биомассы хлореллы стимулирует актуальную азотфиксацию в почве под фасолью в фазе цветения фасоли; в момент уборки урожая, а также в других экспериментальных вариантах такого эффекта не обнаружено (рис. 1А).

В отличие от азотфиксации, процессы дени-

трификации вызывают потерю биодоступного азота из почвы, что нежелательно с точки зрения обеспечения растений азотом. Как видно из рис. 1Б, внесение биомассы хлореллы вызвало снижение актуальной денитрификации почвы при возделывании фасоли, в том числе в сочетании с биопрепаратом МПК (биопрепарат ЦБК вызывал такой эффект сам по себе). Положительное влияние внесения биомассы хлореллы проявлялось и в фазе цветения, и в фазе уборки урожая. Внесение биомассы хлореллы способствует сохранению, а в ряде случаев — и росту фонда биодоступного азота в почве.

В связи с усилением парникового эффекта и вызванными им глобальными изменениями кли-

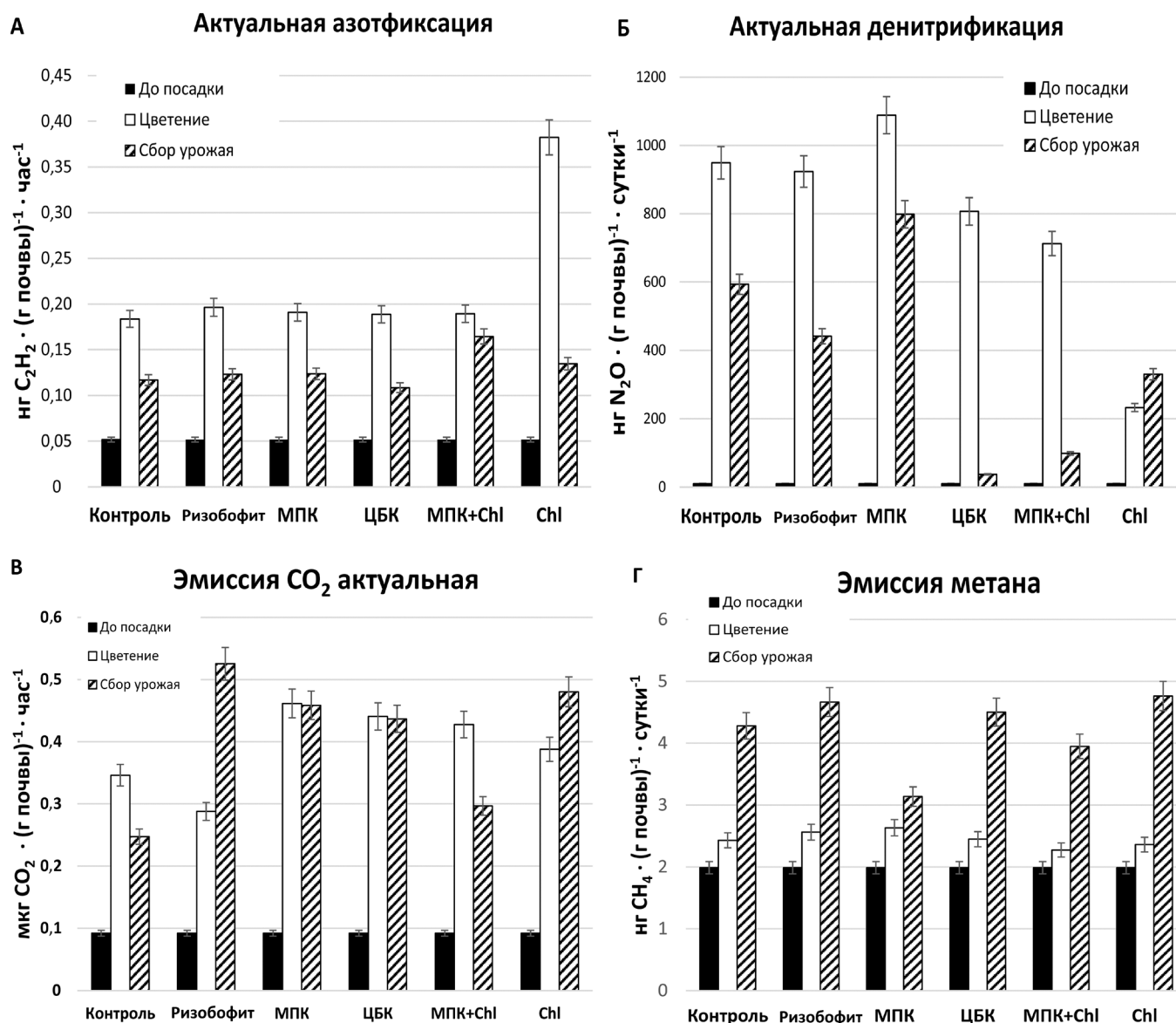


Рис. 1. Влияние обработки семян биопрепаратами из биомассы бактерий и микроводорослей на биологическую активность почвы. А — азотфиксация, Б — эмиссия метана, В — денитрификация и Г — эмиссия CO₂ в почве под фасолью сорта «Стрела» в различные фазы вегетационного цикла. Контроль — необработанные семена; «Ризобифит», МПК, ЦБК — ризобийно-цианобактериальные биопрепараты; Chl — биомасса микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, обогащенная фосфором (подробное описание в разделе «Материалы и методы»).

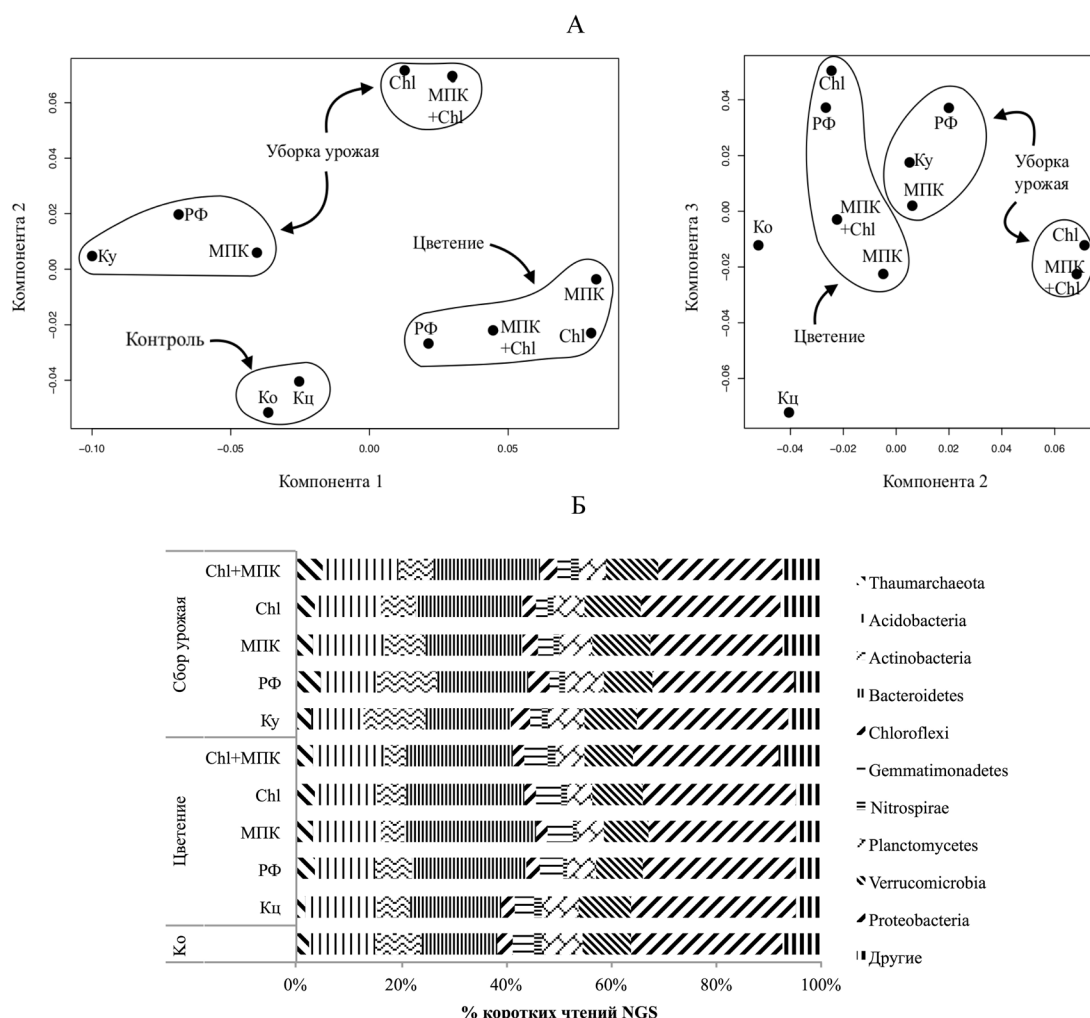


Рис. 2. β - и α -разнообразие почвенного микробиома: сравнение таксономического состава методом главных компонент по значениям индекса Мориситы-Хорна (А) и таксономический состав образцов на уровне филума, исследованный методом высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагмента гена 16S рРНК (Б). Ко — общий контроль почвы для двух фаз (почва перед посевом), Кц — контроль в фазу цветения фасоли, Ку — контроль в период уборки урожая.

мата значительное внимание привлекает эмиссия «парниковых газов», таких как метан и двуокись углерода, из почв [15]. Оценка вклада этого процесса в наблюдаемые изменения климата вызывает оживленные дебаты, однако снижение эмиссии «парниковых газов» (или хотя бы сохранение ее на текущем уровне) считается одной из важных целей. В наших экспериментах внесение биомассы хлореллы вызывало некоторое увеличение актуальной эмиссии CO_2 по сравнению с контролем только в фазе уборки урожая; в других экспериментальных вариантах зарегистрирован сходный по величине эффект (рис. 1В). Влияние исследованных биопрепаратов на эмиссию метана из почвы под фасолью в фазе цветения было незначительным, но во всех экспериментальных вариантах к началу фазы уборки урожая эмиссия метана значительно увеличивалась (рис. 1Г). При этом эмиссия метана при обработке

биопрепаратами, а также при внесении биомассы хлореллы не отличалась достоверно от контроля (кроме варианта с обработкой биопрепаратом МПК, вызывавшей снижение эмиссии метана в фазе уборки урожая). Таким образом, внесение биомассы хлореллы, как и любое дополнительное внесение органического углерода, может повышать эмиссию CO_2 . При этом достоверного повышения эмиссии метана — газа, более эффективно усиливающего парниковый эффект, не наблюдали.

Важной характеристикой почвы является таксономическая структура населяющих ее микроорганизмов. При-

нимать решение о возможности использования тех или иных удобрений необходимо с учетом их влияния на биоразнообразие почвенных микроорганизмов. В этой связи оценивали влияние внесения биомассы хлореллы и иных вариантов обработки на таксономический состав почвенных бактерий. Эту задачу решали методом метагеномного анализа (см. Материалы и методы).

На основании рассчитанных значений индекса сходства Мориситы-Хорна сделан вывод о том, что состав прокариотических сообществ почвы в ризосфере растения в большей степени определялся стадией культивирования, чем типом обработки (рис. 2А). В целом, для образцов ризосферной почвы было характерно преобладание следующих филумов бактерий: Acidobacteria (10,17–14,89% от общего числа чтений в наборе данных), Bacteroidetes (14,56–25,28%), Proteobacteria (26,01–31,39%) и

Verrucomicrobia (8,57–11,19%) (рис. 2Б). В ряде проб наблюдалась высокая частота встречаемости (до 12,12% от общего числа чтений) последовательностей Actinobacteria. Представители филума Planctomycetes были отмечены в несколько меньшем количестве (5,04–7,72% от общего числа чтений). Также все образцы характеризовались высокой частотой встречаемости архей филума Thaumarchaeota (до 5,25% от общего числа чтений). Существенное значение имеет тот факт, что обилие представителей филумов Actinobacteria, Planctomycetes и Proteobacteria, в частности, Gammaproteobacteria, в почве является важным показателем ее продуктивности [16]. Значительных качественных различий в таксономическом составе образцов ризосферы почвы выявлено не было: почти все обнаруженные группы прокариот присутствовали в каждом исследованном образце. Однако для ряда таксонов наблюдались существенные различия в частоте встречаемости относящихся к ним последовательностей 16S рРНК (рис. 3).

В частности, увеличивалась частота встречаемости в наборе метагеномных данных последовательностей некоторых родов бактерий в период цветения: *Massilia*, *Peredibacter*, *Adhaeribacter*, *Gemmatimonas*, *Flavisolibacter* и *Sphingomonas*. Известно, что бактерии рода *Massilia* являются доминантными обитателями ризосферы некоторых растений [17], а представители Bacteroidetes (куда относятся *Adhaeribacter*, *Flavisolibacter*), так же как Sphingomonadaceae (*Sphingomonas*), отмечены в ризосфере фасоли [18]. Помимо этого, существуют данные о присутствии в ряде случаев почвенной бактерии *Peredibacter* в эндосфере растений [19]. Представители Gemmatimonadates (*Gemmatimonas*) отмечались как в свободной почве, так и в прикорневой растительной зоне [20]. Повышение доли последовательностей всех вышеперечисленных родов бактерий наблюдалось при внесении удобрений.

В случае с представителями Euryarchaeota наблюдалось значительное увеличение относительного содержания соответствующих им последовательностей в почве при добавлении биомассы микроводоросли *C. vulgaris* IPPAS C-1 в период цветения. В фазу уборки урожая представленность данной группы при добавлении биомассы микроводоросли соответствовала вариантам почвы с применением МПК или МПК+ *C. vulgaris* IPPAS C-1. Использование биомассы клеток фототрофного микроорганизма по сравнению с удобрением МПК увеличивало количество последовательностей группы Fibrobacteraceae в фазу цветения, а в период сбора урожая эффект был противоположный. Для почвы с комбинированным применением МПК и биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1 было отмечено значительное увеличение относительного количества чтений, соответствующих группе Euryarchaeota.

Наиболее существенное влияние добавления биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1, в отличие от всех других вариантов, наблюдалось для последовательностей *Rhizobium* (Proteobacteria, Rhizobiaceae) в фазу уборки урожая (рис. 3). Известно, что между бобовыми растениями и бактериями сем. Rhizobiaceae формируются симбиотические взаимоотношения, а инокуляция бобовых культур данными бактериями приводит к повышению урожайности вследствие симбиотической азотфиксации [21, 22]. Количество последовательностей, соответствующих бактерии рода *Steroidobacter* (ее распространение связывают с увеличением антропогенного загрязнения почвы [23]), наблюдалось только при добавлении препарата «Ризобифит». Эксперимент также сопровождался повышением частоты встречаемости последовательностей бактерии рода *Methylobacter*. Эти бактерии способны утилизировать широкий спектр углеродных субстратов, включая карбоновые кислоты, спирты, ароматические соединения, а также соединения, содержащие метильные группы [24]. Рост их обилия может быть связан с обогащением почвы органическим углеродом в результате как внесения биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1, так и экскреции растениями вторичных метаболитов.

В целом стоит отметить, что микробиом почвы в случае применения биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1 как биоудобрения был схож с вариантом использования МПК (как отдельного удобрения, так и совместно с биомассой микроводоросли). Данный факт, как и ранее опубликованные данные [4, 5], подтверждает безопасность использования биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1, поскольку внесение водорослей изменяло микробиом почвы не более чем внесение традиционных химических удобрений.

В заключение следует отметить, что использование биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1 в качестве фосфорного биоудобрения не оказывало в наших экспериментальных условиях негативного влияния на биоразнообразие прокариот и биологическую активность ризосферной почвы. Существенно, что при этом повышалась денитрификация и не увеличивалась эмиссия «парниковых газов». Использование биомассы хлореллы не ослабляло действия ростостимулирующих биопрепаратов на основе ризобий и цианобактерий и наоборот, (циано)бактериальные биопрепараты не снижали эффект от использования биомассы хлореллы. Сказанное выше

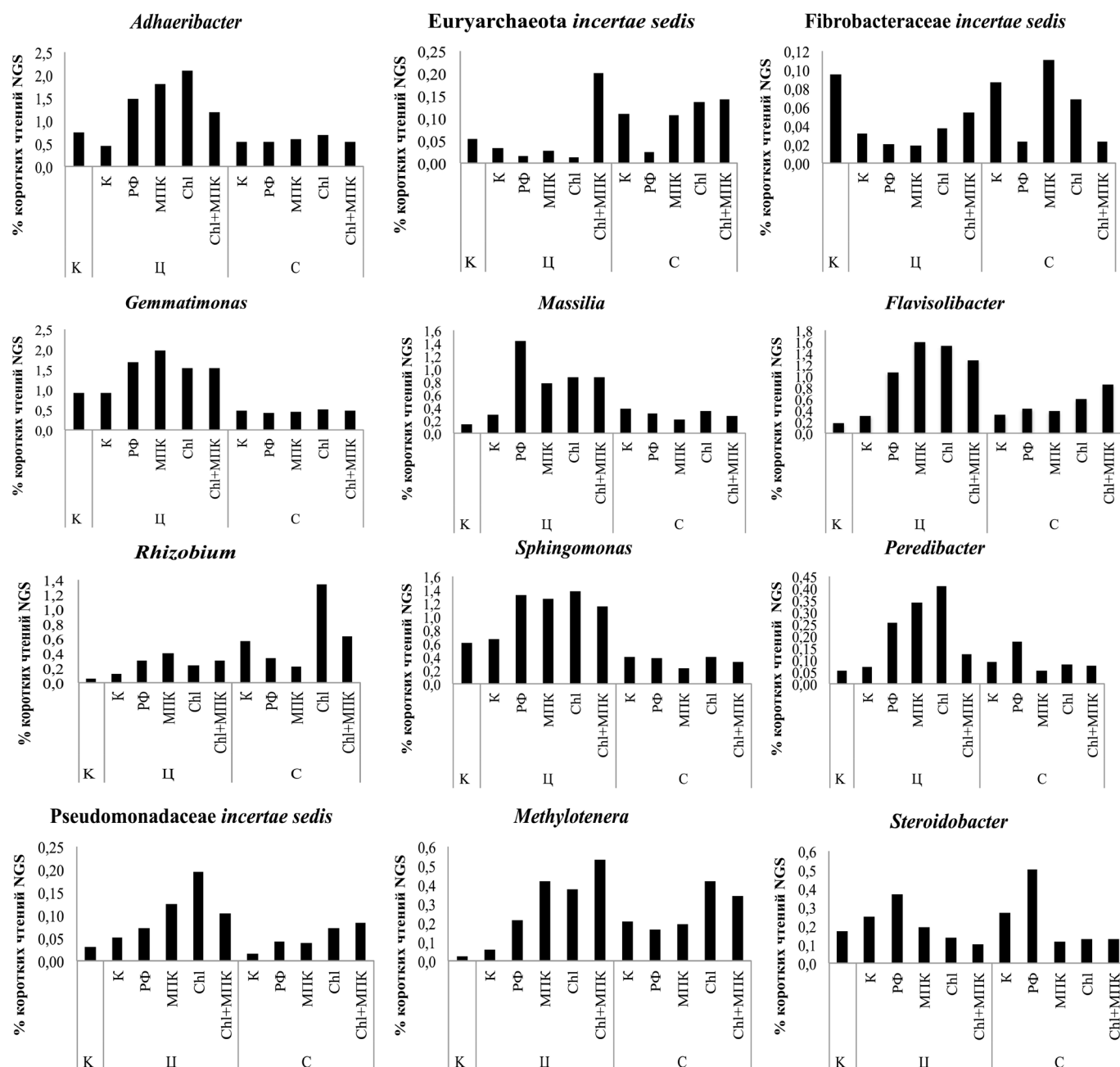


Рис. 3. Сравнение представленности отдельных групп бактерий из микробиома почвы на основе относительного количества последовательностей фрагмента гена 16S рРНК соответствующих таксономических групп.

подтверждает принципиальную возможность замены (по крайней мере, частичной) химических удобрений фосфорными биоудобрениями из биомассы микроводорослей при возделывании фасоли. Проверка применимости биомассы микроводорослей при возделывании других культур потребует дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность к.б.н. в.н.с. кафедры биоинженерии биологического факуль-

тета МГУ К.А. Чеканову за помощь в обработке метагеномных данных и написании статьи. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.616.21.0080/RFMEFI61617X0080).

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daneshgar S., Callegari A., Capodaglio A., Vaccari D. The potential phosphorus crisis: resource

conservation and possible escape technologies: a review // *Resources*. 2018. Vol. 7. N 2: 37.

2. *Melia P.M., Cundy A.B., Sohi S.P., Hooda P.S., Busquets R.* Trends in the recovery of phosphorus in bioavailable forms from wastewater // *Chemosphere*. 2017. Vol. 186. P. 381–395.

3. *Solovchenko A., Verschoor A.M., Jablonowski N.D., Nedbal L.* Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2016. Vol. 34. N 5. P. 550–564.

4. *Mulbry W., Westhead E.K., Pizarro C., Sikora L.* Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer // *Bioresource Technol.* 2005. Vol. 96. N 4. P. 451–458.

5. *Schreiber C., Schiedung H., Harrison L. et al.* Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants // *J. Appl. Phycol.* 2018. Vol. 30. N 5. P. 2827–2836.

6. *Kuznetsov A.G., Pogosyan S.I., Konyukhov I.V., Vasilieva S.G., Lukyanov A.A., Zotov V.S., Nedbal L., Solovchenko A.E.* Possibilities of optical monitoring of phosphorus starvation in suspensions of microalga *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N. 3. P. 118–123.

7. *Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Selyakh I. et al.* Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited // *Algal Res.* 2019. Vol. 43: 101651.

8. Дерюгин И.П., Кулюкин А.Н. Питание и удобрение овощных культур. М.: Изд-во МСХА, 1998. 326 с.

9. *Kublanovskaya A., Chekanov K., Solovchenko A., Lobakova E.* Cyanobacterial diversity in the algal–bacterial consortia from Subarctic regions: new insights from the rock baths at White Sea Coast // *Hydrobiologia*. 2019. Vol. 830. N 1. P. 17–31.

10. *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 // *ISME J.* 2011. Vol. 5. P. 908–916.

11. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010. Vol. 7. P. 335–336.

12. *Huse S.M., Welch D.B.M., Voorhis A., Shipunova A., Morrison H.G., Eren A.M., Sogin M.L.* VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures // *BMC Bioinformatics*. 2014. Vol. 15: 41.

13. *Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O.* The SILVA and «all-species living tree project (LTP)» taxonomic frameworks // *Nucleic*

Acids Res. 2013. Vol. 42. N D1. P. D643–D648.

14. *Horn H.S.* Measurement of «overlap» in comparative ecological studies // *Am. Nat.* 1966. Vol. 100. N 914. P. 419–424.

15. *Smith K.A., Ball T., Conen F., Dobbie K.E., Massheder J., Rey A.* Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes // *Eur. J. Soil Sci.* 2003. Vol. 54. N 4. P. 779–791.

16. *Chang H.X., Haudenshield J.S., Bowen C.R., Hartman G.L.* Metagenome-wide association study and machine learning prediction of bulk soil microbiome and crop productivity // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8: 519.

17. *Ofek M., Hadar Y., Minz D.* Ecology of root colonizing Massilia (Oxalobacteraceae) // *PloS One*. 2012. Vol. 7. N 7: e40117.

18. *Pérez-Jaramillo J.E., Carriyn V.J., Bosse M., Ferrero L.F., de Hollander M., Garcia A.A., Ramírez C.A., Mendes R., Raaijmakers J.M.* Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits // *ISME J.* 2017. Vol. 11. N 10. P. 2244–2257.

19. *Campisano A., Albanese D., Yousaf S., Pancher M., Donati C., Pertot I.* Temperature drives the assembly of endophytic communities' seasonal succession // *Environ. Microbiol.* 2017. Vol. 19. N 8. P. 3353–3364.

20. *Novello G., Gamalero E., Bona E., Boatti L., Mignone F., Massa N., Cesaro P., Lingua G., Berta G.* The rhizosphere bacterial microbiota of *Vitis vinifera* cv. pinot noir in an integrated pest management vineyard // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8: 1528.

21. Beck D.P., Materon L.A., Afandi F. Practical Rhizobium-legume technology manual. Technical manual No. 19. Aleppo: ICARDA, 1993. 389 pp.

22. Мишустин Е.Н. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. 149 с.

23. *Fahrbach M., Kuever J., Remesch M., Huber B.E., Kämpfer P., Dott W., Hollender J.* *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 2008. Vol. 58. N 9. P. 2215–2223.

24. *Kalyuzhnaya M.G., Beck D.A., Suci D., Pozhitkov A., Lidstrom M.E., Chistoserdova L.* Functioning *in situ*: gene expression in *Methylobacterium mobilis* in its native environment as assessed through transcriptomics // *ISME J.* 2010. Vol. 4. N 3. P. 388–398.

Поступила в редакцию 10.07.2019 г.

После доработки 19.09.2019 г.

Принята в печать 05.10.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE EFFECT OF THE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE) BIOMASS APPLICATION ON YIELD, BIOLOGICAL ACTIVITY, AND THE MICROBIOME OF THE SOIL DURING BEAN GROWING

A.A. Kublanovskaya¹, S.A. Khapchaeva², V.S. Zotov², P.A. Zaytsev¹, E.S. Lobakova¹,
A.E. Solovchenko^{1,*}

¹Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gori 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Leninsky Prospekt 33–2, Moscow,
119071, Russia

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

The current problem with phosphorus fertilizers are shortage of rock phosphate from which it is produced and adverse impact of their production and use on the environment. A promising solution is use of phosphorus-rich biomass of microalgae as biofertilizer, but possible impact of such fertilizers on the biological activity and microbiome of soils remain unknown in many aspects. We investigated the effect of *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 biomass application on yield, biological activity, efficacy of the rhizobia- and cyanobacteria-based growth promoting formulations, as well as the microbiome of the soil during cultivation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cvr. «Strela». Total and specific yield, actual nitrification and denitrification, carbon dioxide and methane emission were determined for soil samples from the rhizosphere. The taxonomic structure of the prokaryotic community of the bean rhizosphere was determined by NGS of 16S rRNA gene amplicons on the Illumina platform. The metagenomic data were analyzed using software tools QIIME and VAMPS. It was found that the application of biomass of *C. vulgaris* IPPAS C-1 as a phosphorus biofertilizer increased the bulk yield of beans. It also allowed to achieve the specific yield (per plant) level provided by traditional fertilizers. The biomass application did not (i) impact the biological activity of the soil, (ii) did not increase the level of denitrification, and (iii) did not increase significantly the soil emission of the «greenhouse gases». The *Chlorella* biomass application hamper the growth-promoting effect of the bacterial preparations made from rhizobia and cyanobacteria. Also, no significant changes in the taxonomic composition of the soil of the rhizosphere microbiome upon the application of the *Chlorella* biomass were revealed. Collectively, the results indicate the possibility of at least partial replacement of chemical fertilizers with phosphorus biofertilizers from microalgae biomass in the field growing of beans.

Keywords: *biofertilizer, microbiome, metagenome, microalgae, Chlorella vulgaris, phosphorus nutrition*

Сведения об авторах

Кублановская Анна Андреевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: shanina.anna.andr@yandex.ru

Хапчаева Софья Арсеновна — мл. науч. сотр. группы альгобиотехнологии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Биотехнологии РАН». Тел.: 8-495-952-33-09; e-mail: sakhapchaeva.1990@gmail.com

Зотов Василий Сергеевич — канд. биол. наук, руководитель группы Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Биотехнологии РАН». Тел.: 8-495-952-33-09; e-mail: algo.consortium@gmail.com

Зайцев Петр Андреевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: petr_zaitcev@yandex.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: elena.lobakova@gmail.com

Соловченко Алексей Евгеньевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru