

## ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРОВО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СКЛАДУ МІКРОБІОМУ ЧОРНОЗЕМУ ЦІЛИННОГО В СТЕПУ УКРАЇНИ

*М.В. Пати́ка<sup>1</sup>, О.Л. Тонха<sup>1</sup>, В.М. Сінченко<sup>2</sup>,  
А.М. Гончар<sup>1</sup>, Т.І. Пати́ка<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
вул. Героїв Оборони, 13, корп. 4, Київ, 03041, Україна

<sup>2</sup>Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України,  
вул. Клінічна, 25, Київ, 03141, Україна  
e-mail: npatyka@gmail.com

**Мета.** Провести комплексні дослідження ресурсів біому і структури мікробного (прокаріотного) різноманіття, яке формується в цілинному чорноземі, на прикладі Українського природного степового заповідника «Михайлівська цілина». **Методи.** Мікробіологічні – посіви мікроорганізмів різних фізіологічних груп на поживні середовища, визначення коефіцієнтів функціональної спрямованості. Молекулярно-біологічні – екстракція тотальної ДНК, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації 16S рРНК, аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, біоінформативний аналіз. **Результати.** Встановлено, що в середньому в шарі ґрунту 0–40 см найвищою біогенністю характеризувався варіант лісосмуги, де показник досягав 39,9 млн КУО/г, що пов'язано із надходженням значної кількості рослинних решток, далі у порядку зменшення: абсолютна цілина (31,0) → рілля (29,5) → переліг (26,2) → кошена цілина (23,1 млн КУО/г). **Висновки.** Молекулярно-біологічний аналіз складу еубактеріальних ценозів чорноземів виявив значне домінування некультивованих видів бактерій у варіанті «абсолютна цілина» (до 68%) у порівнянні з варіантом «рілля» (до 17%). Аналіз поліморфізму прокаріотного комплексу чорноземів виявив зменшення біорізноманіття бактеріальних угруповань за застосування оранки.

**Ключові слова:** природний заповідник «Михайлівська цілина», чорнозем типовий, метагеномний склад, філотипова структура, прокаріотний комплекс, профіль tRFLP, мікробне різноманіття.

Ґрунтовий комплекс мікроорганізмів обумовлює гумусоутворення на всіх рівнях еволюційного формування організованих систем, починаючи з трансформації високомолекулярних сполук рослинного матеріалу і закінчуючи утворенням простих гумусових речовин та їх перетворенням або фрагментарним накопиченням і поступовим ускладненням, що в цілому пов'язано з процесами ґрунтоутворення. Мікробний біом і його метаболіти в залежності від трофічної організації та його активності є структурними «блоками» добудови й оновлення вже існуючих гумусових сполук.

Встановлено, що біологічні властивості ґрунтів безпосередньо залежать від біорізноманіття ґрунтових мікроорганізмів та функціонування різних еколого-трофічних груп [1]. Біологічна активність ґрунтових мікроорганізмів визначає родючість, екологічний та трофічний стан ґрунтів.

Видовий склад мікро- та мікобіоти поряд з фізичними, фізико-хімічними властивостями – важливий показник якості ґрунту. У зв'язку зі змі-

нами навколишнього середовища набуває актуальності вивчення еколого-трофічних груп мікроорганізмів на заповідних територіях. На даний час більша частина ґрунтових ресурсів України знаходиться під впливом антропогенних факторів, зокрема аграрного землекористування. Внаслідок цього відбуваються зміни складу і формування біому еубактеріального комплексу ґрунту та його трофічних режимів. Тому заповідні території з абсолютно цілиними землями та ділянки у межах сільськогосподарських земель можуть слугувати чистим екологічним контролем для природних і окультурених ґрунтів у відповідних ґрунтово-кліматичних зонах і є важливими з точки зору теорії та практики збереження біорізноманіття, відтворення та управління природними ресурсами [2, 3].

Мета даної роботи – дослідити біогенність мікробного біому та його функціонально значущого метабіому еубактеріального комплексу цілинного чорнозему на прикладі Українського природного степового заповідника «Михайлівська цілина».

**Матеріали і методи.** Для комплексних досліджень біогенності мікробного біому та його функціонально значущого метабіому еубактеріального комплексу ґрунтів різного використання було обрано чорноземи типові середньосуглинкові на лесі, зона Лісостепу. Схема і дослідні об'єкти наведено на рис. 1.

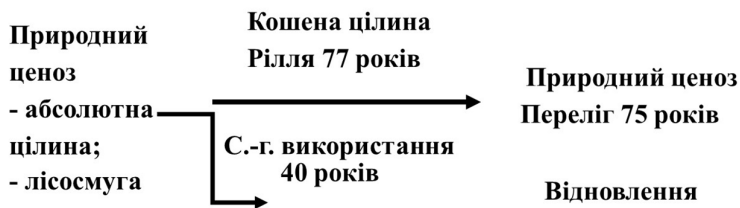


Рис. 1. Блок-схема дослідних об'єктів

Зразки чорнозему, які досліджувались в лабораторних умовах, відбирались у межах верхнього біологічно активного шару ґрунтів гумусового горизонту або по всьому профілю (до 40 см) усіх досліджуваних ґрунтів.

Чорноземи типові природного степового заповідника «Михайлівська цілина» знаходяться в межах північно-західної підпровінції лівобережної високої провінції Лісостепової зони чорноземів типових та сірих опідзолених ґрунтів (ЛС41) [2, 4]. Ґрунтовий покрив заповідника, в основному, представлений чорноземами типовими середньосуглинковими. Зразки ґрунтів для досліджень були відібрані з цілинної ділянки заповідника (абсолютна цілина), періодично кошеної (1 раз на 2 роки) ділянки цілинного степу (кошена цілина), ділянки перелогу з 1965 року, ділянки лісосмуги, насадженої кленом у 1952–1956 рр. (лісосмуга), а також на полі № 4 польової сівозміни (рілля з 1936 року) КСП «Червона Зірка» Лебединського району Сумської області. Досліджувані чорноземи утворилися під впливом дернового процесу ґрунтоутворення на карбонатному лесі і характеризуються однаковою будовою і близькою грубизною генетичних горизонтів (табл. 1).

**Генетичні горизонти чорнозему типового середньосуглинкового на лесі в залежності від варіантів його використання**

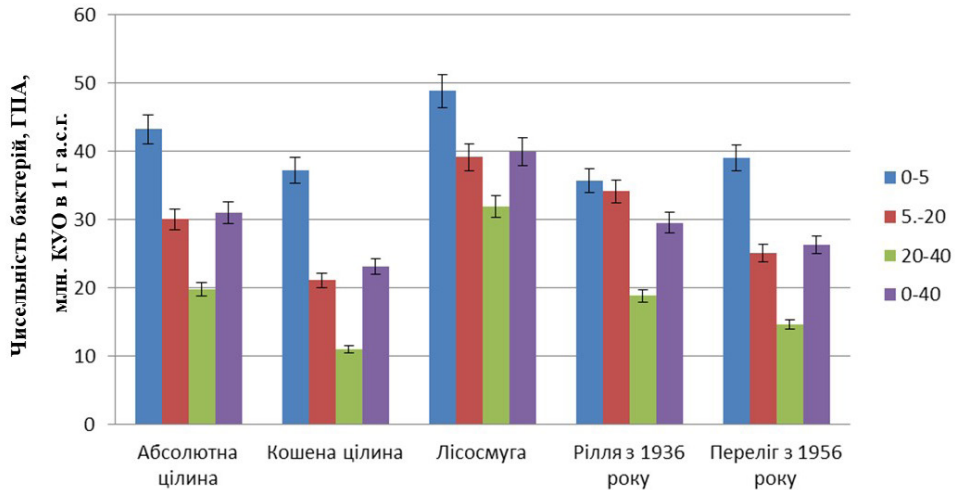
| Генетичний горизонт | Абсолютна цілина | Кошена цілина | Лісосмуга | Переліг з 1965 року | Рілля з 1936 року |
|---------------------|------------------|---------------|-----------|---------------------|-------------------|
| Hd                  | 4                | -             | 4         | 4                   | -                 |
| H(к)                | 37               | 36            | 32        | 38                  | 39                |
| Hрк                 | 41               | 41            | 41        | 41                  | 39                |
| HPк                 | 47               | 40            | 43        | 46                  | 43                |
| Phк                 | 31               | 39            | 46        | 36                  | 39                |

Чисельність мікроорганізмів різних фізіологічних груп визначали методом посіву ґрунтових суспензій на відповідних елективних поживних середовищах за використання ними різних мінеральних і органічних субстратів, в тому числі і азоту [5, 6, 18]. Спрямованість мікробних процесів у ґрунті визначено за допомогою коефіцієнтів мінералізації-імобілізації азоту (Км.-і.), мікробної трансформації органічної речовини ґрунту (Кмт), оліготрофності (Ко.) [6, 14].

Відпрацьовано оригінальну методику екстракції тотальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів [7, 15, 16]. Електрофоретичне розділення загальної мікробної ДНК ґрунту проводили у 1% агарозному гелі. Візуальну детекцію зразків ДНК і очищення ґрунтової ДНК від домішок гумінових кислот здійснювали за методом D. Moreira [8]. В дослідженні використовували маркер молекулярних мас (1500 bp, Generuler DNA Ladders від ThermoScientific, США). Для ампліфікації фрагмента 16S рРНК прокариот проводили ПЛР реакцію з флуоресцентно-міченими праймерами EU3 (631\*:5'- AGGCCTAACACATGCAAGTC-3', 1494г: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC-3'). Таксономічну структуру прокариот визначено за методом аналізу поліморфізму довжин термінальних рестрикційних фрагментів (Terminal restriction fragment length polymorphism – tRFLP) [9-11, 17, 19]. tRFLP аналіз отриманих фрагментів 16S рРНК проводили в автоматичному капілярному секвенаторі CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) згідно з рекомендаціями виробника. Ступінь насичення метагеному окремими таксономічними одиницями визначали і описували за допомогою двох параметрів – довжини термінальних рестрикційних фрагментів маркерного гена (положення окремого піка на tRFLP профілі) і доли цього фрагмента в сумарній ДНК (площ під піком). Для видової класифікації фрагментів tRFLP використовували програму TRFLP Fragsort [9, 12]. Крім цього, аналізували нуклеотидні послідовності та перевіряли їх ідентичність з відповідними послідовностями 16S рРНК бази даних GenBank. Біоінформативний аналіз результатів секвенування здійснювали за допомогою програми Vector NTI Advance [13]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили загальноприйнятими методами з комп'ютерним опрацюванням отриманих даних за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2017.

**Результати.** Чисельність бактерій суттєво змінювалась під впливом навколишнього середовища упродовж незначних проміжків часу в залежності від температури, вологості, стану рослинного покриву тощо.

Склад і кількість мікроорганізмів тісно пов'язані із середовищем їх існування та глибиною досліджуваного шару ґрунту. У середньому за п'ятнадцятирічний період досліджень (рис. 2) фітоценотичний склад ґрунтового покриву обумовлював біогенність чорнозему типового «Михайлівської цілини», що в більшій мірі проявлялось у кореневмісних шарах ґрунту (0–5 і 5–20 см).



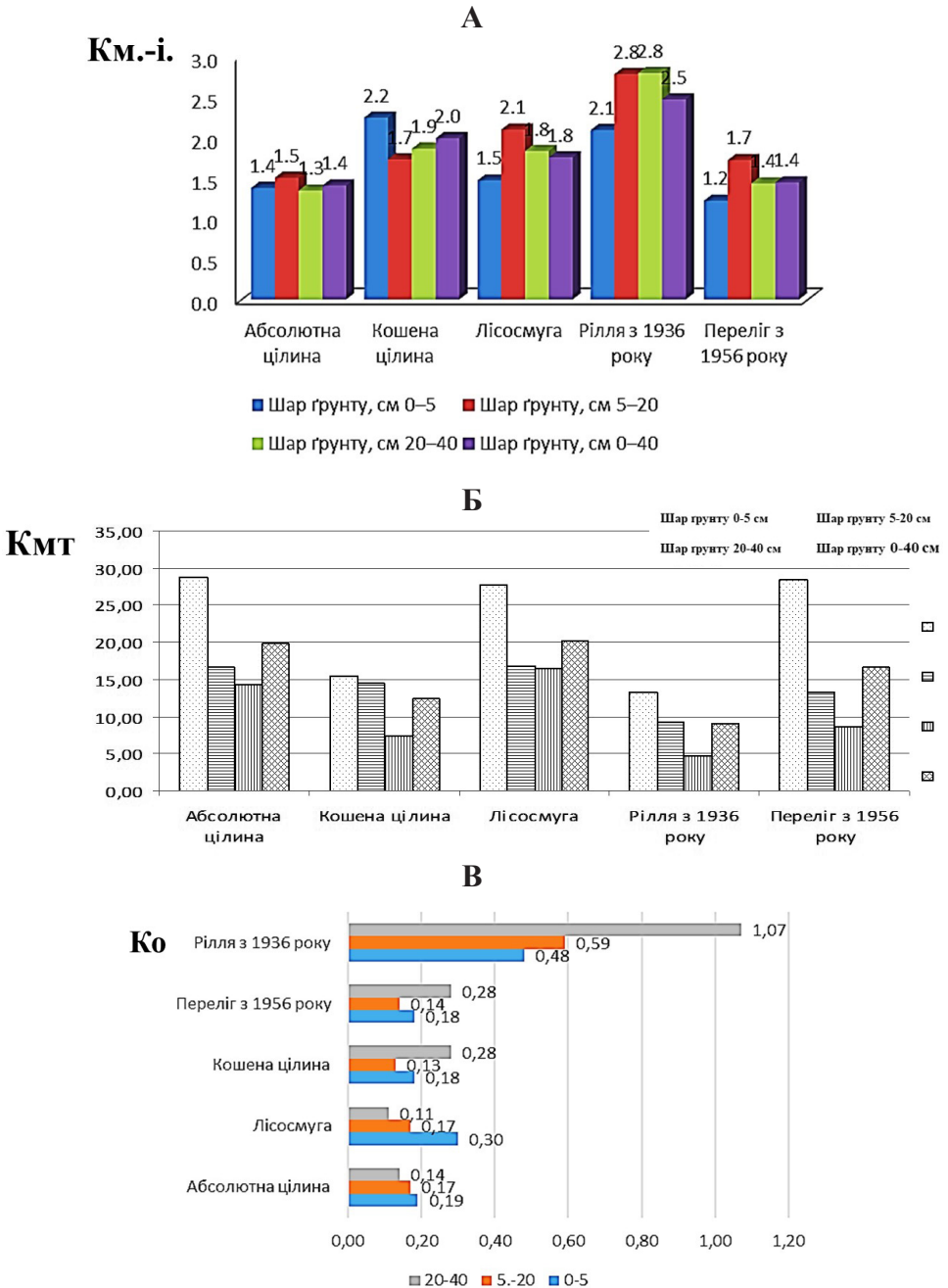
**Рис. 2. Біогенність чорнозему типового середньосуглинкового «Михайлівської цілини» за різних природних фіто- і агроценозів**

Так, біогенність чорнозему типового кореневмісного шару 0–5 см, визначена за показником загальної чисельності бактерій, в 1,6–3,6 рази була вищою, ніж у шарі ґрунту 0–40 см і характеризувалась найменшими показниками на ріллі, а найбільшими – у лісосмузі і абсолютній цілині, що, очевидно, пов'язано з ґрунтовими процесами внаслідок залуження і наявності значної біомаси рослинних решток у лісосмузі. За показниками біогенності мікробіоти чорноземи типові в шарі 0–5 см можна розмістити у наступній послідовності (в сторону зменшення): лісосмуга → абсолютна цілина → переліг → цілина кошена → рілля. Слід зазначити, що у шарі 5–20 см на збільшення чисельності ґрунтової мікробіоти також впливали водно-повітряний і тепловий режими. Тому у вищезазначеній послідовності біогенної активності ґрунтової мікробіоти варіант дослідів «рілля» займає місце після варіанту «цілина кошена». Біогенність шару 20–40 см була меншою порівняно з шаром 5–20 см у 1,5–2,0 рази, за виключенням варіанту лісосмуги.

У середньому в шарі ґрунту 0–40 см найвищою біогенністю характеризувався варіант лісосмуги, де цей показник досягав 39,9 млн КУО/г, що пов'язано із надходженням значної кількості рослинних решток, далі у порядку зменшення: абсолютна цілина (31,0) → рілля (29,5) → переліг (26,2) → кошена цілина (23,1 млн КУО/г). Тобто, розорювання цілинних земель сприяє підвищенню біогенності, а без достатньої кількості органіки у вигляді рослинних решток і добрив для живлення мікроорганізмів призводить до розкладу ґрунтового гумусу. Найбільша чисельність бактерій знаходиться у верхньому шарі ґрунту на глибині 5–15 см.

На глибині 25 см їх кількість у 10–20 разів менша. У більш глибоких шарах (2,0–6,0 м) фіксується незначна їх кількість.

Коефіцієнт мінералізації-імобілізації (Км.і.) у чорноземі під різними фітоценозами наведено на рис. 3. Найвищий коефіцієнт у шарі 5–20 см був у варіанті ріллі, далі у порядку зменшення: лісосмуга → кошена цілина і переліг → абсолютна цілина. За коефіцієнтом мінералізації-імобілізації найбільш сприятливі умови для накопичення органічної речовини склались у варіантах абсолютної цілини 1,3–1,5 і перелогу 1,2–1,7.



**Рис. 3. Коефіцієнти мінералізації-імобілізації (А), мікробної трансформації органічної речовини (Б) та оліготрофності (В) у чорноземі типовому під різними фітоценозами в умовах заповідника «Михайлівська цілина»**

Порівняно з абсолютною цілиною в шарі 0–40 см під лісосмугою даний коефіцієнт був більшим на 29%. Сільськогосподарське використання чорноземів, а саме: варіант «рілля» ( $K_{m-i}=2,09-2,78$ ) і «кошена цілина» ( $K_{m-i}=1,73-2,24$ ), призводили до руйнування органічної речовини. Якщо порівняти варіанти «рілля» і «кошена цілина» з оптимальним значенням (1,0), то отримано відповідно у 2,5 і 2,0 рази більші показники на чорноземах типових, а на ріллі чорнозему звичайного – у 2,0 рази менші значення, що пов'язано з неоптимальним співвідношенням C:N у ґрунті і недостатнім забезпеченням рослин азотом.

**Обговорення.** За результатами попередніх досліджень кількості мікроорганізмів, які розкладають органічні форми азоту, асимілюють мінеральні форми азоту, коефіцієнта мінералізації-іммобілізації під різними фітоценозами доведено, що кількість мікроорганізмів, які розкладають органічні азотовмісні сполуки у чорноземах типових заповідника більша у 3,7 рази у варіанті «абсолютна цілина», у 3,3 рази — «кошена цілина», у 1,2 рази – у варіанті «рілля» порівняно з чорноземами звичайними. Накопичення органічної речовини у шарі 0–40 см природного заповідника найвище у варіанті абсолютної цілини і перелогу, що вказує на інтенсивне гумусоутворення у ґрунті цих варіантів, а найбільш інтенсивно мікробіологічні процеси проходили у варіантах «рілля», «кошена цілина», «лісосмуга». Нашими дослідженнями доведено, що коефіцієнт мікробної трансформації ( $K_{MT}$ ) ґрунтової органічної речовини природного заповідника «Михайлівська цілина» змінювався під різними природними фіто- і агроценозами та відповідно за шарами ґрунту (рис. 3). Найбільше значення показника зафіксовано під усіма фіто- і агроценозами у 0–5-сантиметровому шарі, найменше – у шарі 20–40 см. Характеризуючи 0–40-сантиметровий шар за цим показником, у порядку зменшення можливо розмістити варіанти у наступний ряд: лісосмуга → абсолютна цілина → переліг → кошена цілина → рілля. Тобто, незначна кількість рослинних решток у варіанті ріллі (агроценозу) і кошеної цілини призводить до зменшення цих показників. Залуження і заліснення активізувало мікробну трансформацію ґрунтової органічної речовини до рівня природних ценозів. Але показник мікробної трансформації органічної речовини без аналізу маси рослинних решток, яка надійшла до ґрунту, не дає можливості аналізувати напрямок процесів.

Коефіцієнт оліготрофності (рис. 3) у варіанті абсолютної цілини ( $K_o=0,14-0,19$ ), лісосмуги ( $K_o=0,11-0,30$ ), кошеної цілини ( $K_o=0,13-0,28$ ) і перелогу ( $K_o=0,14-0,28$ ) вказує на забезпечення ґрунтової біоти легкодоступними поживними речовинами. Збільшення оліготрофності на ріллі свідчить про посилення конкуренції за доступний азот між мікроорганізмами і рослинами і призводить до втрат органічної речовини.

Чисельність педотрофних мікроорганізмів і тих, які трансформують компоненти гумусу, наведено в таблиці 2. Результати досліджень свідчать про те, що розорювання чорноземів призводило до зниження вмісту загального гумусу. За 80 років сільськогосподарського використання ґрунтів вміст загального гумусу в чорноземі ріллі знижувався на 49% по відношенню до показника абсолютної цілини і становив 5,9% у 5–20-сантиметровому шарі. Найвищим вмістом загального гумусу характеризувався

варіант абсолютної цілини, у якому він становив 8,80%, з глибиною знижувався і у шарі 20–40 см становив 6,25%, а у середньому у шарі 0–40 см – 7,52%. Відбувалась суттєва диференціація вмісту гумусу за шарами, що можна пояснити розміщенням основної частини кореневої системи рослин в прошарку 0–10 см і рослинних решток на поверхні ґрунту, продукти розкладу яких, в тому числі і новоутворені гумусові речовини, надходять у верхню частину ґрунту, збагачуючи її на гумус.

**Таблиця 2**

**Кількість педотрофних і гуматрозкладаючих мікроорганізмів під різними фітоценозами чорноземів типових природного заповідника «Михайлівська цілина»**

| Варіант використання | Шар ґрунту, см | Вміст гумусу, % | Педотрофні мікроорганізми, млн КУО/г | Гуматрозкладаючі мікроорганізми, млн КУО/г |
|----------------------|----------------|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|
| Абсолютна цілина     | 0–5            | 10,11±0,05      | 13,00±0,36                           | 1,50±0,09                                  |
|                      | 5–20           | 8,80±0,04       | 14,10±0,18                           | 1,25±0,06                                  |
|                      | 20–40          | 6,25±0,06       | 14,34±0,30                           | 1,39±0,42                                  |
|                      | 0–40           | 7,52±0,05       | 13,8±0,28                            | 1,38±0,19                                  |
| Кошена цілина        | 0–5            | 9,86±0,05       | 13,73±0,06                           | 2,72±0,42                                  |
|                      | 5–20           | 7,80±0,05       | 6,25±0,36                            | 1,30±0,24                                  |
|                      | 20–40          | 5,33±0,06       | 5,58±0,30                            | 1,44±0,12                                  |
|                      | 0–40           | 6,56±0,06       | 8,52±0,24                            | 1,82±0,26                                  |
| Лісосмуга            | 0–5            | 9,42±0,06       | 15,77±0,30                           | 3,09±0,06                                  |
|                      | 5–20           | 8,40±0,04       | 13,08±0,48                           | 1,62±0,09                                  |
|                      | 20–40          | 6,48±0,06       | 10,68±0,36                           | 0,78±0,08                                  |
|                      | 0–40           | 7,40±0,05       | 13,2±0,38                            | 1,83±0,08                                  |
| Рілля з 1936р.       | 0–5            | 5,99±0,05       | 11,90±0,18                           | 2,38±0,25                                  |
|                      | 5–20           | 5,91±0,04       | 11,50±0,18                           | 1,78±0,18                                  |
|                      | 20–40          | 5,40±0,05       | 9,32±0,42                            | 0,63±0,08                                  |
|                      | 0–40           | 5,51±0,05       | 10,9±0,26                            | 1,60±0,17                                  |
| Переліг              | 0–5            | 8,68±0,05       | 13,50±0,30                           | 1,44±0,12                                  |
|                      | 5–20           | 7,30±0,03       | 11,50±0,28                           | 0,67±0,18                                  |
|                      | 20–40          | 5,79±0,04       | 5,72±0,09                            | 0,80±0,05                                  |
|                      | 0–40           | 6,54±0,04       | 10,2±0,22                            | 0,97±0,12                                  |

Різниця у кількості педотрофних і гуматрозкладаючих мікроорганізмів між шарами 5–20 і 20–40 см була в межах похибки дослідження. Таким чином, не лише педотрофні мікроорганізми впливали на утворення рухомих гумусових речовин.

Чорноземи типові кошеної цілини характеризувалися дещо нижчим вмістом загального гумусу у верхньому шарі ґрунту – 7,79%, кількість педотрофних мікроорганізмів і рухомих гумусових речовин були в 2 рази меншими, ніж у варіанті абсолютної цілини. З глибиною (20–40 см) вміст гумусу становив 5,33%, що на 17% менше за показник варіанту абсолютної цілини, а кількість педотрофних мікроорганізмів була в 2,6 рази меншою. Несуттєво змінювалась чисельність гуматрозкладаючих мікроорганізмів порівняно з аналогічним шаром ґрунту абсолютної цілини. В середньому, в шарі 0–40 см вміст загального гумусу був меншим на 15%, кількість педотрофних мікроорганізмів – на 62%, а гуматрозкладаючих мікроорганізмів – на 32% більшим порівняно з варіантом абсолютної цілини.

Перелоговий режим впливав на біоту ґрунту і відповідно на його гумусний стан. У верхній частині досліджуваної товщі ґрунту на перелозі (5–20 см), у порівнянні з ріллею, відбулося суттєве накопичення гумусових речовин. При цьому вміст загального гумусу був вищим на 23,5%, кількість гуматрозкладаючих мікроорганізмів зменшилась відповідно на 166%, а кількість педотрофних мікроорганізмів не відрізнялася. За 64 роки перелогового режиму не відбулося відновлення гумусу до показників чорноземів абсолютно цілинного степу.

Багаторічна деревна рослинність впливала на біоту і гумусовий режим ґрунту. Так, у шарі чорнозему 0–20 см під лісосмугою вміст загального гумусу становив 8,60%, а у шарі 0–40 см – 7,40%. У цілому під лісосмугою складались сприятливі умови для гумусоутворення і гуміфікації порівняно з ріллею. Під деревною рослинністю більшою кількістю педотрофних мікроорганізмів була на 21%, а гуматрозкладаючих мікроорганізмів – на 14%, ніж у варіанті абсолютної цілини. Кількість гуматрозкладаючих мікроорганізмів була найвищою у варіанті лісосмуги в прошарку 0–5 см.

У варіанті ріллі по відношенню до цілинних ґрунтів був значно менший вміст педотрофних мікроорганізмів, які розкладають рухомі гумусові речовини, але кількість мікроорганізмів, які розкладають частину гумусових речовин – гуматрозкладаючих, підвищувалась на 16% в прошарку 0–40 см. Отже, до ґрунту надходить недостатня кількість рослинних решток і енергетичного матеріалу, що є джерелом живлення для мікроорганізмів і тому вони мінералізують гумус ґрунту.

Зменшення кількості рослинних решток у варіанті ріллі сприяла збільшенню чисельності гуматрозкладаючих мікроорганізмів порівняно з абсолютною цілиною в 1,2 рази (прошарок 0–40 см). Коефіцієнт кореляції між кількістю гуматрозкладаючих мікроорганізмів і індексом педотрофності становив  $r = -0,685 \pm 0,09$ . Різне використання чорноземів типових призводило до зміни спрямованості мікробної трансформації органічної речовини. При розорюванні цілинних земель збільшувалась кількість гуматрозкладаючих мікроорганізмів на 16% («Михайлівська цілина») у порівнянні з абсолютною цілиною. У ґрунт ріллі надходила недостатня кількість рослинних залишків і енергетичного матеріалу, що призводило до мінералізації гумусу. Викошування цілинної рослинності зменшувало вміст загального гумусу на 3–17%, педотрофних мікроорганізмів – на 62–157% і підвищувало на 32% кількість гуматрозкладаючих мікроорганізмів у порівнянні з абсолютною цілиною («Михайлівська цілина»).

Аналіз профілів поліморфізму прокаріотного комплексу чорноземів природного заповідника «Михайлівська цілина» (рис. 4), отриманих за допомогою методу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (tRFLP), виявив зменшення біорізноманіття бактеріального комплексу ґрунту за його використання в ріллі.

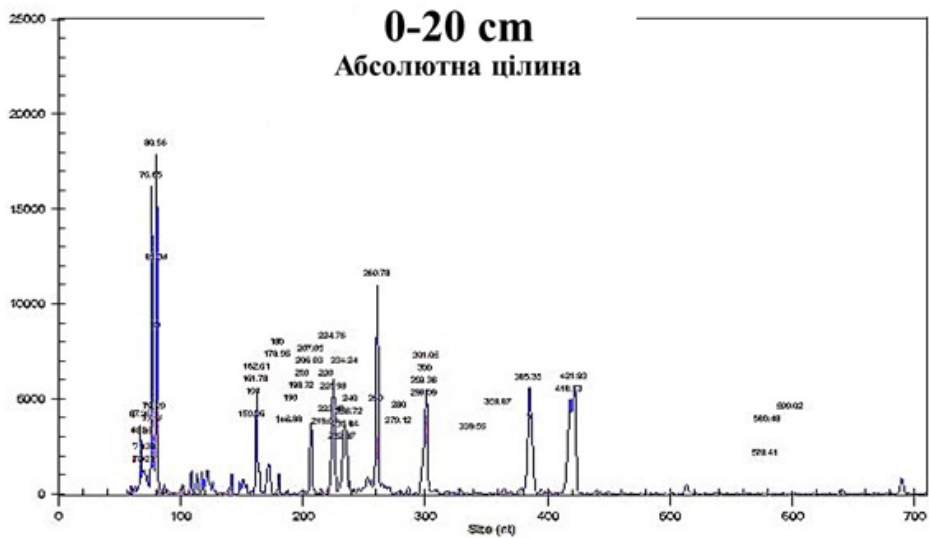
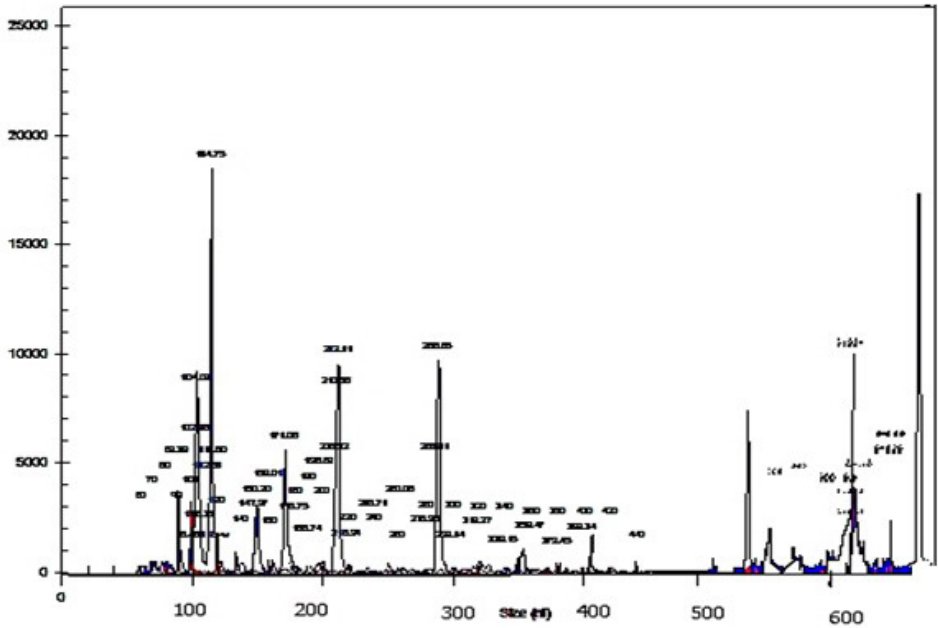
У варіанті абсолютної цілини у шарі 0–20 см формуються більш концентровані високомолекулярні фрагменти від 450 до 700, порівняно з оранкою – 70–400 пар нуклеотидів відповідно.

Прокаріотний комплекс варіанту «абсолютна цілина» шару 0–20 см характеризувався наявністю фрагментів домінуючих видів від 4000 до 19000 пар нуклеотидів. Аналогічні показники отримані і в шарі 20–40 см цього ж варіанту з розміром фрагментів домінуючих видів від 2000 до



30000 пар нуклеотидів. Шар 0–20 см варіанту «рілля» характеризувався розмірами фрагментів домінуючих видів до 18000, шар 20–40 см характеризувався меншою кількістю фрагментів домінуючих видів – до 13000 пар нуклеотидів відповідно.

Топологія розподілу прокариотних генотипів ґрунтового мікробного комплексу у варіанті абсолютної цілини на дендрограмі (рис. 5) свідчить про наявність 13 основних кластерів, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 44 родів, 68% з яких некультивовані.



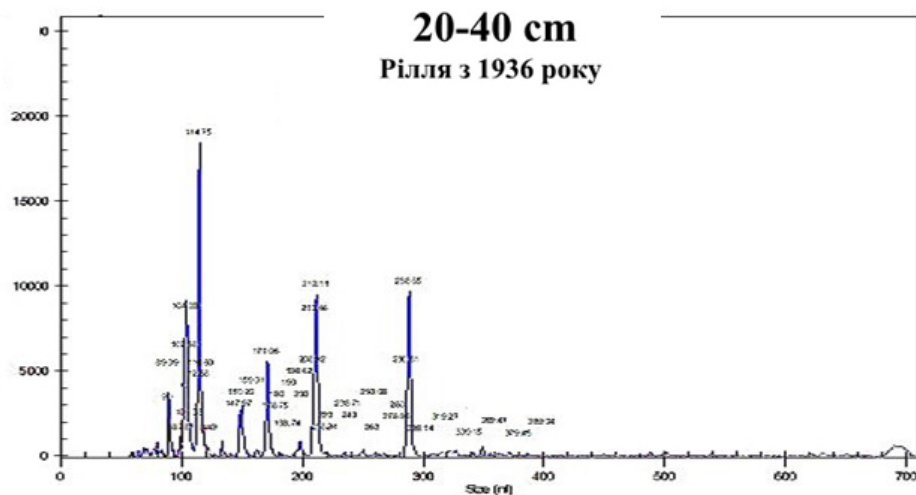
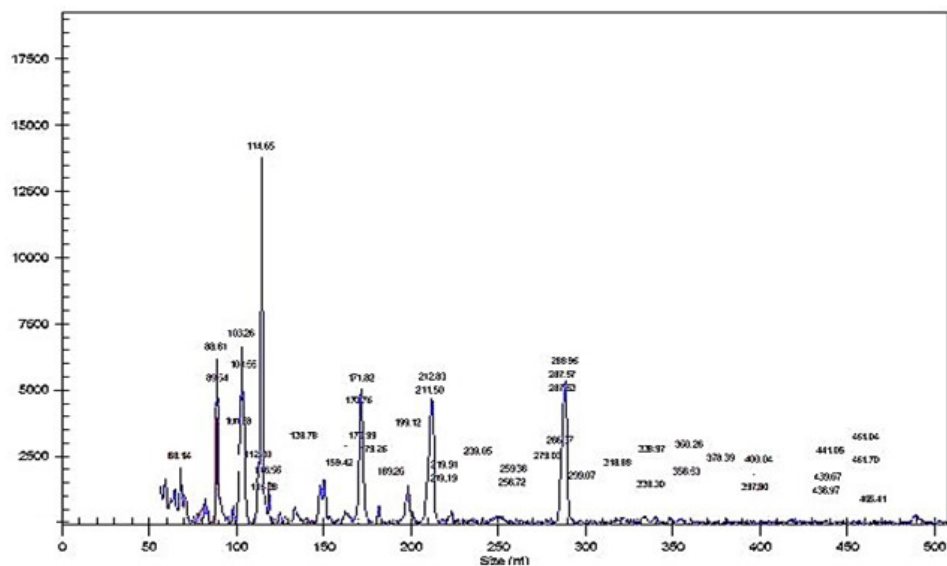
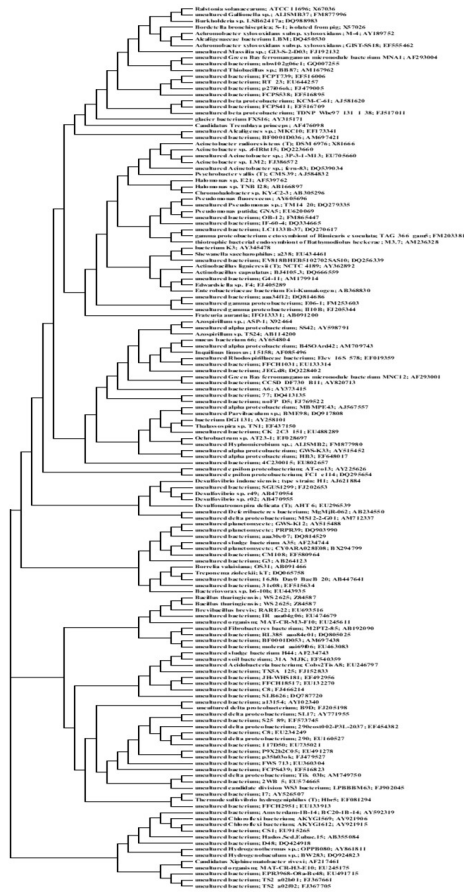


Рис. 4. Різноманіття прокаріот в чорноземах типових природного заповідника «Михайлівська цілина» (профіль tRFLP, рестриктаза Hae III, на осі ординат – розмір термінальних фрагментів (пар нуклеотидів), на осі абсцис – інтенсивність флуоресценції)

У варіанті «рілля» дендрограма (рис. 5) складається із восьми основних кластерів 52 родів, 17% некультивованих. Як на абсолютній цілині, так і на оранці були наявні роди прокаріот, що приймають участь у кругообігу основних елементів живлення (нітрогену, фосфору, калію, сульфору, карбону та ін.): *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Azospirillum*, *Thalassospira*, *Ochrobactrum*, *Desulfovibrio*, *Ralmella*, *Nitrosomonas*, *Beggiatoa*, *Streptotomyces*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Alkalimonas*, *Actinobaculum*, *Citrobacter*, *Verrucomicrobium*, *Pantoea*, *Rhizobium*.

A



B

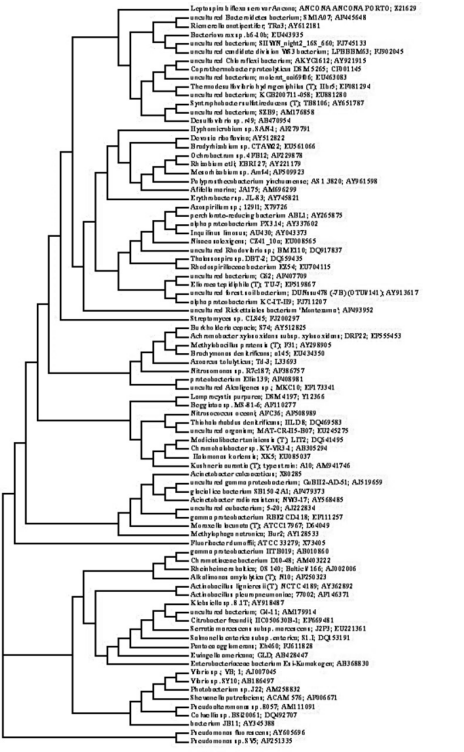


Рис. 5. Генетичний поліморфізм прокаріот в чорноземах типових на абсолютній ділянці (А) та ріллі з 1932 р. (Б) заповідника «Михайлівська ділина»

Крім того, абсолютна цілина характеризувалася домінуванням прокаріот родів, яких не було виявлено на оранці: *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Bordetella*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Candidatus Hepatoplasma*, *Psychrobacter*, *Chromohalobacter*, *Candiobacterium*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Zoogloea*, *Mycoplasma*, *Rhodospirillum*, *Rhodospira*, *Desulfospira*, *Borrelia*, *Bacteriovorax*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Thermodesulfovibrio*, *Mesorhizobium*, *Thiomonas*.

На оранці були наявні домінуючі роди еубактеріального комплексу: *Leptospira*, *Riemerella*, *Bacteriovorax*, *Coprothermobacter*, *Thermodesulfovibrio*, *Syntrophobacter*, *Hyphomicrobium*, *Prostheco bacterium*, *Erythrobacter*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Methanolacinis*, *Lactobacillus*, *Azoarcus*, *Lamprocystis*, *Nitrosococcus*, *Thiohalomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Sphingomonas*, *Moraxella*, *Methylophaga*, *Legionella*, *Pseudoalteromonas*, *Serratia*, *Salmonella*, *Ewingella*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Colwellia*.

Молекулярно-біологічний аналіз складу еубактеріальних ценозів чорноземів «Михайлівської цілини» виявив значне домінування некультивованих видів бактерій у варіанті «абсолютна цілина» (до 68%) у порівнянні з оранкою (до 17%). Тобто, відповідно, їх функціональне та метаболічне значення як частини загального біому ґрунту – це питання величезного окремого блоку метагеномних досліджень.

Антропогенне навантаження на чорноземи, а саме варіант «рілля», сприяє збідненню генетичних ресурсів мікробіоти ґрунтів (145 видів на варіанті абсолютної цілини, 86 – на оранці) і корінній зміні її якісного складу. У варіанті абсолютної цілини наявні 13 основних кластерів, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 44 родів. На оброблювальній ділянці мікробний комплекс складається з восьми кластерів та 52 родів, домінуючими представниками яких є види, що відповідають за відновлення родючості при несприятливих умовах.

Дослідженнями встановлено, що як на абсолютній цілині, так і у варіанті оранки сформувалися мікробоценози, домінуюче положення в яких зайняли різні види бактерій (табл. 3). Молекулярно-біологічний аналіз складу цих груп у варіанті «абсолютна цілина» виявив численне домінування представників філогенетичних груп *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Bacterium*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Actinobaculum*. Відсоток трапляння *Pseudomonas* та *Bacillus* склав від 2 до 3,4%, проте некультивовані види бактерій становили 68%. На оброблюваній ділянці домінували представники *Actinobacteria*, *Vibrio*, *Actinobaculum*, *Proteobacterium*, *Achromobacter* – 7 %, а некультивовані види бактерій склали 17%. Саме цей список домінантів є одним з репрезентативних показників таксономічної структури мікробних комплексів агроєкосистем, що свідчить про функціональну спрямованість формування ґрунту і процесів, що в ньому відбуваються.

Більша кількість гетерогенної групи бактерій роду *Pseudomonas* отримана на варіанті абсолютної цілини порівняно з оранкою, що пов'язано із більшою біомасою рослинних решток, яка надходить до ґрунту. Абсолютна цілина у зв'язку зі значним біорізноманіттям рослинного покриття характеризувалася наявністю домінуючих представників бактерій-

деструкторів рослинних решток, гумусоутворювачів та меншою кількістю представників, що здійснюють фітотоксичний вплив та їх мінералізацію.

**Таблиця 3**

**Вплив розорювання цілини на склад домінуючих родів бактерій в чорноземах типових природного заповідника «Михайлівська цілина», % трапляння**

| Рід бактерій                | Абсолютна цілина | Розорана ділянка<br>(варіант «рілля з 1936 року») |
|-----------------------------|------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Pseudomonas</i>          | 3,4              | 2,3                                               |
| <i>Acetobacter</i>          | 4,1              | 2,3                                               |
| <i>Proteobacterium</i>      | 3,4              | 7,0                                               |
| <i>Desulfovibrio</i>        | 3,4              | 1,2                                               |
| <i>Achromobacter</i>        | 1,3              | 1,2                                               |
| <i>Halomonas</i>            | -                | 1,2                                               |
| <i>Bacillus</i>             | 2,0              | -                                                 |
| <i>Azospirillum</i>         | 2,0              | 1,2                                               |
| <i>Actinobacillus</i>       | 2,0              | 10,4                                              |
| <i>Vibrio</i>               | -                | 3,4                                               |
| Інші                        | 10,4             | 47,2                                              |
| <i>Uncultured bacterium</i> | 68               | 17                                                |

Значне домінування представників роду *Achromobacter*, що утворюють колоїдний слиз та здатні цементувати ґрунтові агрегати, була вищою в 4 рази у варіанті абсолютної цілини.

Наявність монокультури порушує функціонування природних мікро-боценозів, і у ґрунті відновлюються процеси саморегуляції, збереження метаболічної активності в несприятливих умовах навколишнього середовища. Вищенаведеною властивістю наділяють ґрунт бактерії *Actinobacillus*, *Vibrio*, кількість яких також переважала за оранки. Тобто, за представленістю інших бактерій, в т.ч. некультивованих, у варіанті абсолютної цілини і оброблюваної ділянки вони були близькі між собою і склали відповідно 78,4 та 69,8%, що свідчить про зменшення мікробного поліморфізму при розорюванні цілини та відповідно перебудову умов середовища. Оцінка екологічного стану прокаріотного ґрунтового комплексу з урахуванням екологічних індексів домінування та різноманіття наведені у таблиці 4.

**Таблиця 4**

**Екологічна оцінка чорнозему типового за індексами домінування і мікробного біорізноманіття «Михайлівської цілини»**

| Варіант                                              | Шар ґрунту,<br>см | Екологічні індекси |                      |
|------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|
|                                                      |                   | домінування Балога | різноманіття Шеннона |
| Оброблювана ділянка<br>(варіант «рілля з 1936 року») | 0–20              | 0,1978             | 0,7409               |
|                                                      | 20–40             | 0,0589             | 1,3250               |
| Абсолютна цілина                                     | 0–20              | 0,2177             | 1,3516               |
|                                                      | 20–40             | 0,0625             | 0,8064               |

Різниця за індексом домінування у варіантах «абсолютна цілина» і «рілля» не перевищувала 5 %, а за показником біорізноманіття були вищими до 37% на цілині, при цьому за індексом різноманіття на оброблюваній ділянці більші показники спостерігалися в шарі 20–40 см, а на варіанті «абсолютна цілина» – 0–20 см.

Дослідження біогенності мікробного біому та його функціонально значущого метагеному еубактеріального комплексу цілинних чорноземів дає можливість зробити наступні висновки. Показник біогенності без аналізу фізіологічних груп мікроорганізмів не дає можливості аналізувати направленість ґрунтових процесів, а є лише біоіндикатором таксономічної одиниці підтипу. Найвища біогенність чорнозему типового (0–40 см) встановлена у варіанті лісосмуги, де показник досягав 39,9 млн КУО/г, що пов'язано із надходженням значної кількості рослинних решток, далі у порядку зменшення: абсолютна цілина (31,0) → рілля (29,5) → переліг (26,2) → кошена цілина (23,1 млн КУО/г); ступінь збагаченості мікробними ценозами чорноземів типових (кількість мікроорганізмів, які розкладають органічні азотовмісні сполуки) природного заповідника «Михайлівська цілина» більша у 3,7 рази у варіанті «абсолютна цілина», в 3,3 рази – у варіанті «кошена цілина», в 1,2 рази – у варіанті «рілля» порівняно з чорноземами звичайними. Викошування цілинної рослинності призводить до зменшення показника біогенності в шарі 0–40 см, у 1,1–1,4 рази, кількості гетеротрофів (на МПА) – на 25,5–41,5%, показника мікробної трансформації ґрунтової органічної речовини – в 1,5–1,8 рази, кількості стрептоміцетів – у 4,5 рази, кількості педотрофних мікроорганізмів – в 1,6 рази і до збільшення гуматрозкладаючих мікроорганізмів – в 1,3 рази порівняно з абсолютною цілиною. У чорноземах типових «Михайлівської цілини» як у варіанті абсолютної цілини, так і в варіанті ріллі сформувалися мікробценози, домінуюче положення в яких зайняли різні види бактерій. Розорювання цілинних чорноземів сприяє збідненню генетичних ресурсів мікробіоти ґрунтів (145 видів у варіанті абсолютної цілини, 86 – у варіанті ріллі) і корінній зміні її якісного складу. У варіанті абсолютної цілини наявні 13 основних кластерів, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 44 родів. На оброблюваній ділянці мікробний комплекс складається із восьми кластерів та 52 родів, домінуючими представниками яких є види, що відповідають за відновлення родючості за несприятливих умов.

# ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТАВА МИКРОБИОМА ЧЕРНОЗЕМА ЦЕЛИННОГО В СТЕПИ УКРАИНЫ

*Н.В. Патыка<sup>1</sup>, О.Л. Тонха<sup>1</sup>, В.Н. Синченко<sup>2</sup>,  
А.Н. Гончар<sup>1</sup>, Т.И. Патыка<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,  
ул. Героев Оборона, 13, корп. 4, Киев, 03041, Украина

<sup>2</sup>Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины,  
ул. Клиническая, 25, Киев, 03141, Украина

## Резюме

**Цель.** Провести комплексные исследования ресурсов биомов и структуры микробного (прокариотного) разнообразия, которое формируется в целинном черноземе на примере Украинского природного степного заповедника «Михайловская целина». **Методы.** Микробиологические – посеvy микроорганизмов разных физиологических групп на питательные среды, определение коэффициентов функциональной направленности. Молекулярно-биологические – экстракция тотальной ДНК, электрофоретическое разделение продуктов амплификации 16S рРНК, анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов, биоинформативный анализ. **Результаты.** Установлено, что в среднем в слое почвы 0–40 см наивысшей биогенностью характеризовался вариант лесополосы, где показатель достигал 39,9 млн КОЕ/г, что связано с поступлением значительного количества растительных остатков, далее в порядке уменьшения: абсолютная целина (31,0) → пашня (29,5) → перелог (26,2) → космая целина (23,1 млн КОЕ/г). **Выводы.** Молекулярно-биологический анализ состава эубактериальных ценозов черноземов выявил значительное доминирование некультивируемых видов бактерий в варианте «абсолютная целина» (до 68%) по сравнению с вариантом «вспашка» (до 17%). Анализ полиморфизма прокариотного комплекса черноземов продемонстрировал уменьшение биоразнообразия бактериального комплекса почвы при использовании вспашки.

*Ключевые слова:* природный заповедник «Михайловская целина», чернозем типичный, метагеномный состав, филотипическая структура, прокариотный комплекс, профиль tRFLP, микробное разнообразие.

# FEATURES OF THE FORMATION OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL COMPOSITION OF THE MICROBIOME OF CHERNOZEM VIRGIN IN THE STEPPE OF UKRAINE

*N.V. Patyka<sup>1</sup>, O.L. Tonkha<sup>1</sup>, V.N. Sinchenko<sup>2</sup>,  
A.N. Honchar<sup>1</sup>, T.I. Patyka<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,  
13 Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS,  
25 Clinichna St., Kyiv, 03141, Ukraine

## Summary

**The aim.** Conduct a comprehensive studies of biome resources and the structure of microbial (prokaryotic) diversity, which is formed in chernozem virgin on the example of the Ukrainian natural steppe reserve “Mikhailovskaya virgin”, are presented. **Methods.**

Microbiological - cultivation of microorganisms of various physiological groups on nutrient media, determination of the coefficients of functional orientation. Molecular biological – extraction of total DNA, electrophoretic separation of amplification products of 16S rRNA, analysis of restriction fragment length polymorphism, bioinformative analysis. **Results.** It was found that on average in the 0-40 cm soil layer the highest biogenicity was characterized by the forest belt variant, where the figure reached 39.9 million CFU/g, which is associated with the arrival of a significant amount of plant residues, then in order of decreasing absolute virgin (31.0) → arable land (29.5) → shifting (26.2) → skimming virgin (23.1 million CFU/g). **Conclusions.** Molecular and biological analysis of the composition of eubacterial cenoses of chernozem revealed a significant dominance of uncultivated species of bacteria in those «absolute virgin» (up to 68%) compared to «plowing» (17%). An analysis of the polymorphism of the prokaryotic complex of chernozem showed a decrease in the biodiversity of the bacterial groups of the soil when used in arable land.

*Keywords:* natural reserve «Mikhailovskaya virgin», typical chernozem, metagenomic composition, filotypic structure, prokaryotic complex, tRFLP profile, microbial diversity.

1. Gadzalo YM, Patyka MV, Zarishnyak AS. [Agrobiological of the rhizosphere of plants]. Kiev: Agrarian Science; 2015. 368 p. Russian.
2. Shikula MK, Balaev AD, Zabalyuyev VO, Tonkha OL, et al. [Characteristics of the soil cover of the Steppe]. Scientific provision of sustainable development of agriculture in the steppe of Ukraine and the AR of Crimea. Kyiv: Alefa: 2005: 1:205–223. Ukrainian.
3. Buckley DH, Schmidt TM. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*. 2001; 42(1):11–21.
4. Bilyk GI, Tkachenko VS. [Mikhailovsky virgin soil. Soil-biogeocenological studies in the Azov region]. Moscow: Science; 1976; 2:183. Russian.
5. Zvyagintsev DG. [Methods of soil microbiology and biochemistry]. Moscow: Moscow State University; 1991. 330 p. Russian.
6. Netrusov AI, Egorova MA, Zakharchuk LM, et al. Workshop on Microbiology. Moscow: Publishing Center Academy; 2005. 608 p. Russian.
7. Patyka MV, Patyka TI. Method of isolating genomic DNA of soil microorganisms. Patent of Ukraine to the utility model (1255420): 10.05.2018: 9. Ukrainian.
8. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*. 1998; 26(13):3309–3310.
9. Michel Jr, Marsh TL, Reddy CA. Characterization of microbial community structure during composting using analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S pPHK genes. *Microbiol. Composting*. Heidelberg: Springer; 2002. p. 25–42.
10. Patyka NV, Kruglov YuV, Tikhonovich IA, et al. [Profile of restriction fragment length polymorphism (tRFLP) of a complex of prokaryotic microorganisms of podzolic soils]. *Add. NAS of Ukraine*. 2009; 1:187–192. Russian.
11. Ursel M, Schütte E, Abdo Z, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2008; 80(3):365–380.
12. Liu W, Marsh T, Cheng H, Forney L. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Environ. Microbiol.* 1997; 63(11): 4516–4522.



13. Lu Guoqing, Moriyama, Etsuko. Vector NTI, a balanced all-in one sequence analysis suite. In: Briefings in Bioinformatics. 2004; 5(4):378–388.
14. Titova VI, Methods for assessing the functioning of soil microbiocenosis involved in the transformation of organic matter: a scientific and methodological guide. Nizhny Novgorod; 2012: 64.
15. Patyka NV, Kolodyazhnyi AYu, Ibatullin II. The evaluation of metagenome and detection of functionally significant polymorphisms of prokaryotes of soil by method of pyrosequencing. Microbiological journal. 2016; 78(2): 43–51.
16. Patyka TI, Patyka NV, Patyka VF. Phylogenetic interrelations between serological variants of *Bacillus thuringiensis*. Biopolymers and Cell. 2009; 25(3): 240–244.
17. Orlova OV, Vorobyev NI, Sviridova OV, Andronov EE, Kolodyazhny AYu, Moskalevskaya YuP, Patyka NV. Composition and functioning of microbial communities in the decomposition of straw cereals in sod podzolic soil. Agricultural biology. 2015; 50(3): 305–314.
18. Patyka NV, Boroday VV, Zhitkevich NV, Khomenko EV, Gnatyuk TT, Koltunov VA, Patyka VF. Effect of biopreparations on dynamics of the number of bacteria and phytopathogenic fungi in potato agroecosystem. Microbiological journal. 2012; 74(2): 28–35.
19. Patyka NV, Kruglov IV, Berdnikov AM, Patyka VF. Role of *Linum usitatissimum* L. in formation of microbic communities of podzol soils. Microbiological journal. 2008; 70(1): 59–70.

Отримано 15.01.2019