

М. В. Патика, член-кореспондент НААН України **С. П. Танчик**,
О. Ю. Колодяжний, **М. Ф. Іванюк**, **Ю. В. Круглов**,
член-кореспондент НААН України **М. Д. Мельничук**, **Т. І. Патика**

Формування біорізноманіття та філотипової структури еубактеріального комплексу чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої

(Представлено академіком НАН України Д. О. Мельничуком)

Проведено порівняльний філогенетичний аналіз 16S рРНК еубактеріального комплексу чорнозему типового, що сформувався під впливом різних систем землеробства при вирощуванні пшениці озимої. Показано істотну різницю впливу систем землеробства на формування домінуючих філотипів та їх структуру. Встановлено, що філогенетичне різноманіття ґрунтових мікроорганізмів чорноземів типових істотно залежить від спрямування ґрунтових процесів при аграрному використанні.

Ґрунт є головним визначальним природним самовідновлювальним ресурсом, який забезпечує життя на Землі, він є середовищем існування живих організмів, в першу чергу мікроорганізмів. Мікробний ценоз — це один із найрізноманітніших і найпоширеніших типів просторово-функціональної організації живих угруповань на Землі. Мікробіоті належить провідна роль у функціонуванні різних екосистем, вони відіграють ключову роль в утворенні та еволюції ґрунтів, формуванні їх родючості, метаболізмі органічної речовини, біогеохімічній трансформації хімічних елементів [1].

Науково обґрунтоване врахування та функціональне спрямування мікробіологічних факторів у землеробстві є основою до підвищення потенційної та ефективної родючості ґрунтів. Для наукового обґрунтування екологічно збалансованих систем землеробства особливе значення має вивчення закономірностей структури та функціонально-просторового формування мікробного ценозу ґрунту [2]. Дослідження біорізноманіття та генетичного потенціалу ґрунтових мікроорганізмів має фундаментальне значення для розуміння біогеохімічних процесів ґрунтоутворення і становить значний інтерес для вирішення прикладних питань в мікробіології, екології, біотехнології, землеробстві та рослинництві [3].

Дослідження в області класичної ґрунтової мікробіології показали, що чисельність, біомаса і таксономічна структура мікробного комплексу ґрунту залежать від багатьох факторів. Введення ґрунту в активне землекористування призводить до значних змін мікробної складової. Ці зміни накопичуються при тривалому сільськогосподарському використанні земель. Проте при тривалому землекористуванні вплив усіх факторів на формування мікробного комплексу і в цілому на якість ґрунту не вивчено, а від цього залежить система заходів, які забезпечують гомеостаз ґрунтів, а також їх високу продуктивність [4, 5].

Разом з тим показано що, використовуючи класичні методи ґрунтової мікробіології, вдається врахувати не більше 10% ґрунтових мікроорганізмів. Багато мікроорганізмів не культивуються на елективних середовищах. Тому наукові знання в даній області мають вкрай обмежений характер [6].

Останніми роками значного розвитку дістали методи молекулярної біології, зокрема, методи аналізу загальної бактеріальної ДНК (ПЛР, ПЛР в реальному часі, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів та ін.), що істотно розширили можливості дослідження генетичних ресурсів мікробного комплексу ґрунтів аграрного використання [7]. Молекулярно-генетичні методи дають змогу вивчити мікробний ценоз на філогенетичному рівні та ідентифікувати некультивовані (англ. — *unculturable*) і невідомі (англ. — *unknown*) види ґрунтової мікробіоти. Такі методи сприяють розвитку принципово нових можливостей в дослідженнях еубактеріального комплексу ґрунту [3]. Застосування молекулярно-генетичних методів у ґрунтовій мікробіології показало, що в природних умовах існування біорізноманіття і складність мікробних угруповань, як і їх просторово-функціональна різноманітність, значно ширша, ніж очікувалося раніше [1].

Для аналізу еубактеріального комплексу мікроорганізмів як філогенетичний маркер використовується ген РНК малої субодиниці рибосоми (16S рРНК). В результаті вивчення первинної структури нуклеотидних послідовностей 16S РНК створено велику міжнародну базу даних (Gen Bank), яка постійно доповнюється. Аналіз 16S рРНК дає можливість описати філогенетичну структуру прокариотичних угруповань ґрунту і скласти уявлення про філотипове різноманіття бактерій і архей, незалежно від того, культивуються чи не культивуються вони на штучних поживних середовищах [4, 7]. Це є основою для подальшого розвитку досліджень різноманітних ізолятів і некультивованих видів мікробних угруповань ґрунту.

Метою дослідження було проведення порівняльної оцінки біорізноманіття та філотипової структури еубактеріального комплексу чорнозему типового, що сформувався в процесі вирощування пшениці озимої за різних систем землеробства.

Матеріали та методи. Вивчення прокариотного комплексу чорнозему типового проводили в стаціонарному польовому досліді кафедри землеробства та гербології ВСП НУБіП України “Агрономічна дослідна станція” спільно з ДНУ ВНДІ СГМ РАСГН (Санкт-Петербург, Росія).

Територія досліджуваного ґрунту знаходиться в правобережній частині Лісостепу України і входить до складу Білоцерківського ґрунтового району. Рельєф місцевості рівнинний. Ґрунт ділянки — чорнозем типовий малогумусний, за гранулометричним складом — крупнопилуватий середній суглинок.

Прокариотний ґрунтовий комплекс досліджували в період активної вегетації пшениці озимої (*Triticum durum*) з верхнього (0–20 см) орного горизонту при застосуванні різних систем землеробства: 1 — промислової (внесення 12 т/га гною, 300 кг/га NPK мінеральних добрив, інтенсивний захист посівів від бур'янів і шкідливих організмів); 2 — біологічної (внесення 24 т/га органіки без внесення промислових агрохімікатів, використання комплексного біопрепарату для обробки насіння, біологічних засобів захисту посівів), 3 — екологічної (внесення 12 т/га гною, 6 т/га нетоварної частини урожаю, 6 т/га маси поживних сидератів, 150 кг/га NPK мінеральних добрив, обробка насіння комплексним біопрепаратом, застосування хімічних препаратів за критерієм еколого-економічного порогу наявності шкідливих організмів) [8].

Для оцінки біорізноманіття мікрофлори ґрунту застосовували метод аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (англ. — *terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* — tRFLP). Екстракцію ДНК ґрунтових мікроорганізмів виконували на основі методу J. J. Doyle, J. L. Doyle [6, 9], відповідно адаптованого до чорноземних ґрунтів. Візуальну детекцію отриманих зразків ДНК проводили після електрофоретичного розділення

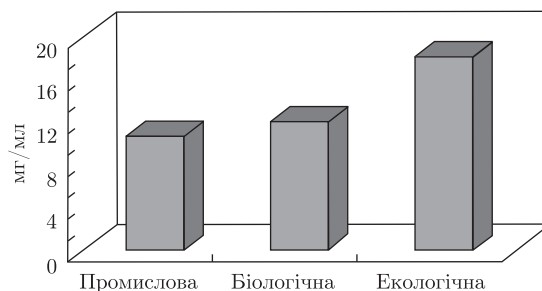


Рис. 1. Кількість тотальної ДНК ґрунтових організмів чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої із застосуванням різних систем землеробства

в 1%-му агарозному гелі [9]. Подальше очищення зразків здійснювали за D. Moreira [10] з певними модифікаціями, що пов'язані з очисткою великої кількості гумінових кислот, що містяться в чорноземних ґрунтах та інгібують процес ампліфікації. Кількісну оцінку тотальної ДНК ґрунтових організмів проводили за допомогою спектрофотометра Beckman DU 800.

Полімеразна ланцюгова реакція 16S рРНК виконувалась флуоресцентно-міченим праймером *Eu3* [10], отриманий ПЛР-продукт піддавали рестрикції синтетичними ендонуклеазами *HaeIII* та *MspI* (обов'язковими і практично незамінними інструментами цього складного процесу). В автоматичному секвенаторі Beckman CEQ 8000 визначали інтенсивність флуоресценції кожного піка, що пропорційний кількості геному ДНК і відповідає таксономічній одиниці певного прокариотного організму.

Для філотипової ідентифікації профілів tRFLP застосовували програму *TRFLP FragmentSort*, на основі ідентифікованих філотипів за 16S еубактеріальної рРНК проводили філогенетичний аналіз за допомогою комп'ютерної програми Vector NTI. Для екологічної характеристики структури еубактеріального комплексу чорнозему типового, на основі профілів tTRFLP, використовували екологічні індекси домінування Сімпсона і різноманіття Шеннона [11].

Результати та їх обговорення. На стадії виділення тотальної ДНК ґрунтових організмів чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої із застосуванням різних систем землеробства показано істотну різницю між ними (рис. 1).

Кількість тотальної ДНК при застосуванні промислової системи землеробства становила 10,73 мг/мл, була вищою при застосуванні біологічної системи — 12,13 мг/мл і найвищою при застосуванні екологічної системи землеробства — 18,20 мг/мл, що свідчить про підвищену біологічну активність та відповідне збільшення біомаси мікроорганізмів. Отримані дані вказують на позитивний вплив науково обґрунтованого одночасного внесення органічної речовини та мінеральних добрив на біологічний потенціал ґрунтових організмів. Пріоритетне використання промислової системи та агрохімікатів призводить до зниження генетичних ресурсів прокариотів чорнозему типового.

Попередній аналіз профілів tRFLP прокариот ґрунту показав, що при вирощуванні пшениці озимої із застосуванням різних систем землеробства формуються еубактеріальні комплекси, що відрізняються як за кількістю виявлених таксономічних одиниць, так і за структурою їх розподілу (рис. 2). Так, структура профілю при застосуванні промислової системи землеробства істотно відрізняється від екологічної та біологічної систем і має значно меншу кількість прокариот, що свідчить про умови, які призводять до зниження різноманіття домі-

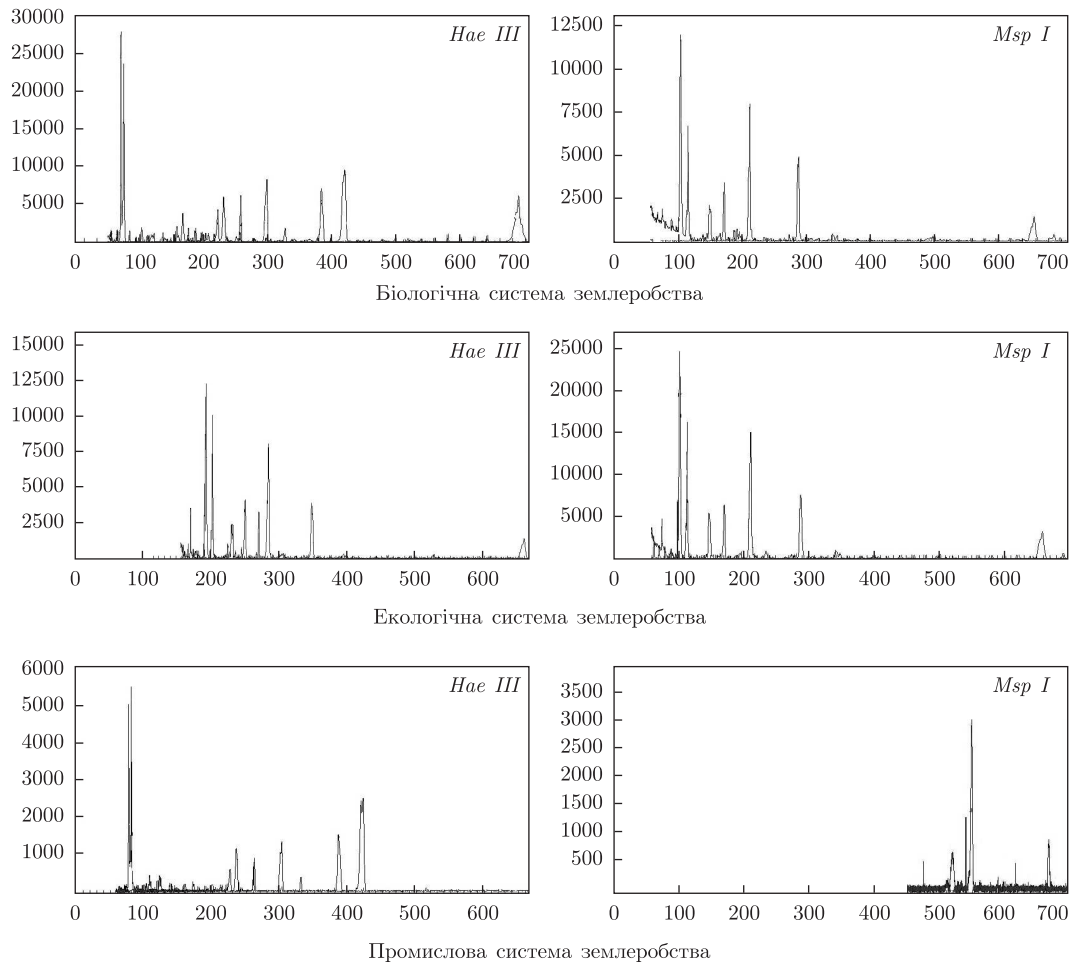


Рис. 2. Профілі структури еубактеріального комплексу чорнозему типового під пшеницею озимую при застосуванні різних систем землеробства (профіль tRFLP, праймер *Eu3*; вісь ординат — діапазон розміру 60–700 п. н.; вісь абсцис — інтенсивність флуоресценції; рестриктази — *Hae III* та *Msp I*)

нуючих видів ґрунтових мікроорганізмів. Мікробний комплекс чорнозему типового при застосуванні екологічної системи землеробства за структурою і рівнем видового різноманіття прокаріотів ґрунту має значну схожість з мікроценозом, що сформувався при використанні біологічної системи. Це підтверджує ідентичність систем землеробства по формуванню умов та ґрунтової родючості за рахунок внесення органічних добрив.

Філогенетичні дендрограми, побудовані на основі отриманих профілів tRFLP, свідчать про істотні зміни філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів при застосуванні різних систем землеробства (рис. 3).

Топологія розподілу прокаріотних філотипів при вирощуванні пшениці озимієї із застосуванням промислової системи землеробства показує наявність семи домінуючих філів, що об'єднують 16 порядків ґрунтових прокаріот. Домінуючими є прокаріоти, що належать до філів *Proteobacteria* та *Firmicutes*. Загалом, структура еубактеріального комплексу, що сформувався при застосуванні промислової системи землеробства, нараховує 101 домінуючий філотип, більшу частину з яких складають некультивовані мікроорганізми (58,42%).

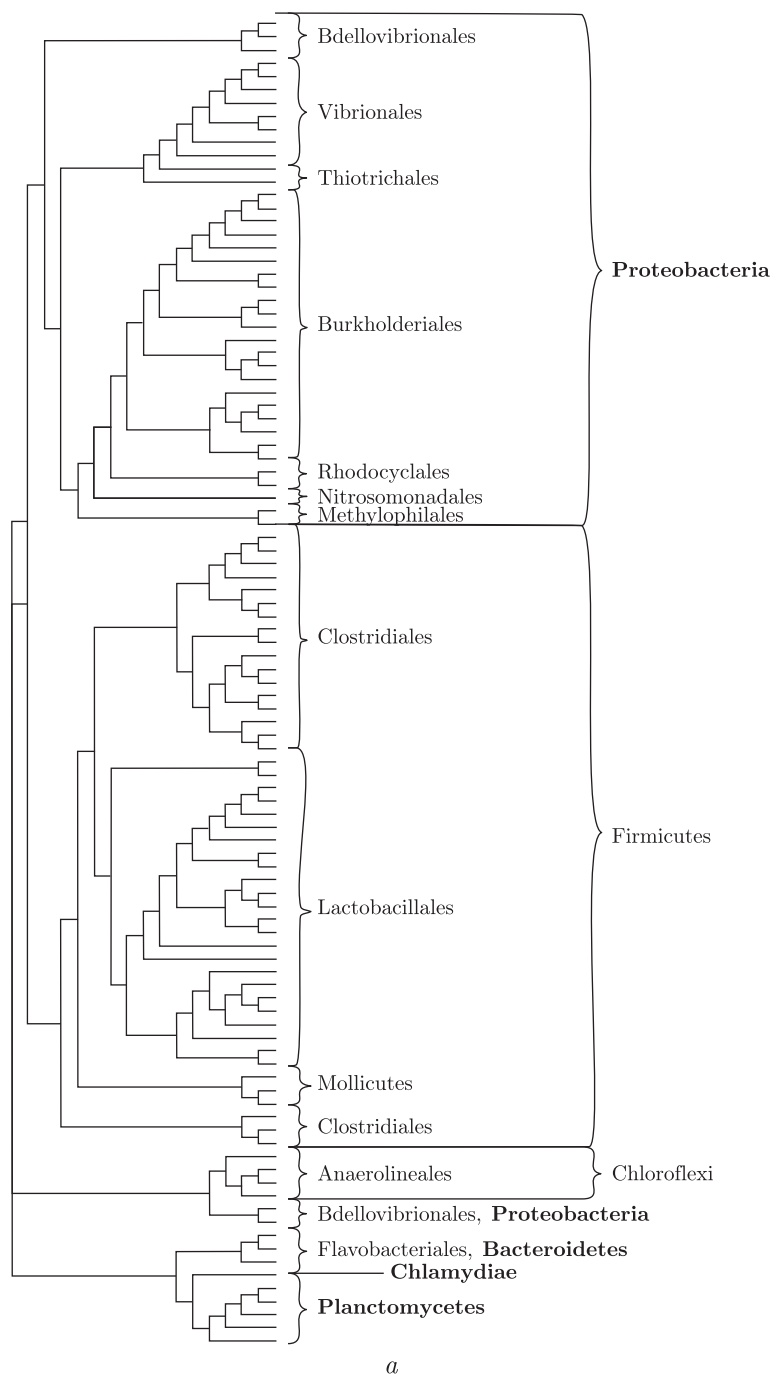


Рис. 3. Філотипова структура еубактеріального комплексу чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої у короткоротаційній сівозміні: *a* — промислова система землеробства; *б* — екологічна система землеробства; *в* — біологічна система землеробства

При застосуванні екологічної системи землеробства склалися умови, що сприяли значному збільшенню видового різноманіття до 394 домінуючих філотипів, 46% з яких складають некультивовані організми, що об'єднують 16 філів. Зазначимо, що спостерігається збільшення різноманіття, в тому числі за рахунок представників інших філів, таких як

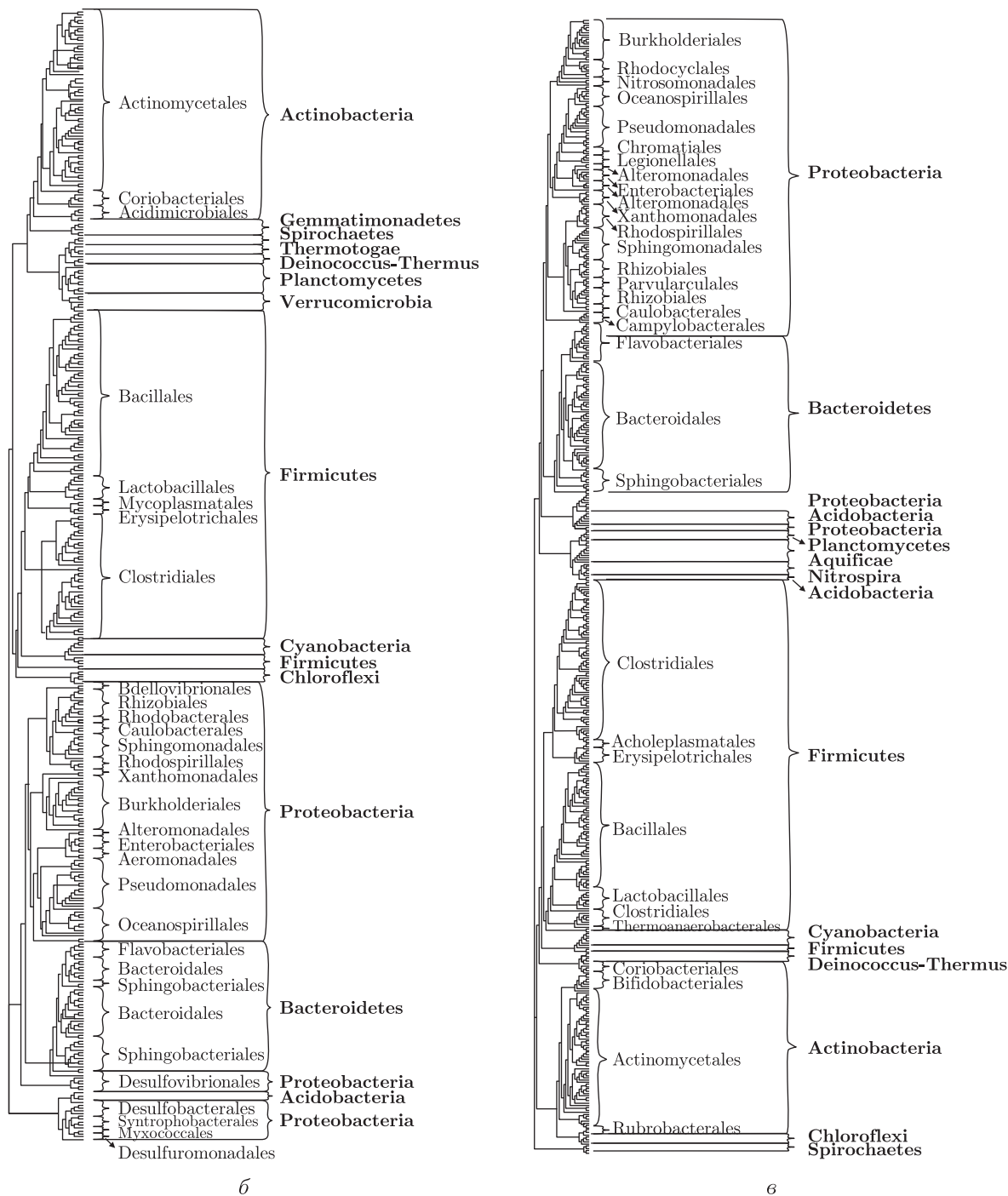


Рис. 3. Продовження

Actinobacteria, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*. Зростання філотипового різноманіття свідчить про різний вплив промислової та екологічної систем землеробства на прокариотний комплекс чорнозему типового та створює умови до різноспрямованості ґрунтових біологічно-хімічних процесів, що формуються при вирощуванні пшениці озимої.

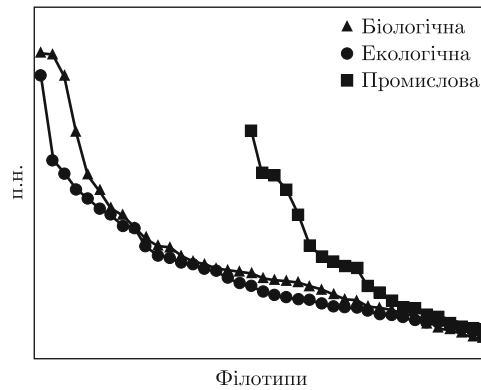


Рис. 4. Зміна домінуючих філотипів ґрунтових мікроорганізмів чорнозему типового в посівах пшениці озимої при застосуванні різних систем землеробства (на основі результатів tRFLP)

Топологія розподілу філотипів еубактеріального ґрунтового комплексу при застосуванні біологічної системи землеробства свідчить про наявність 16 філів, яким відповідають 459 філотипів, 49,9% з яких складають некультивовані організми. При застосуванні біологічної та екологічної систем землеробства встановлено формування ідентичних еубактеріальних комплексів, як за кількістю виявлених філотипів, так і за домінуючими філами, але різних за структурою домінуючих філів.

Треба зазначити, що порівняно з іншими системами різноманіття прокаріот при застосуванні біологічної системи землеробства було найвищим, що пов'язано зі сприятливим поживним режимом ґрунту.

Згідно з результатами визначення екологічних індексів еубактеріального комплексу (табл. 1), найбільше генетичне різноманіття прокаріот було в ґрунті при застосуванні біологічної системи землеробства (1,188), найменше — при застосуванні промислової системи землеробства (1,050), що пояснюється негативним впливом значної кількості агрохімікатів (300 кг/га NPK) на формування та активність мікробного ценозу. Індекс домінування при цьому був відносно низьким, що свідчить про стабільні гомеостатичні системи ґрунтових мікроорганізмів, що склалися в дослідному полі при застосуванні різних систем землеробства.

Аналіз змін структури домінуючих філотипів прокаріотного комплексу (рис. 4) показав різний вплив систем землеробства на формування бактеріальної складової чорнозему типового під посівами пшениці озимої. Так, за кількістю філотипів прокаріотів ґрунту різні варіанти дослідів розміщуються в нисхідному порядку: біологічна система землеробства → екологічна система землеробства → промислова система землеробства. Це пояснюється тим, що систематичне застосування високих доз мінеральних добрив призводить до порушення структури ґрунту та пригнічує розвиток його мікрофлори. Спостерігається спорід-

Таблиця 1. Екологічні параметри прокаріотного комплексу чорнозему типового при вирощуванні озимої пшениці

Індекс	Система землеробства		
	Біологічна	Екологічна	Промислова
Різноманіття (H)	1,188	1,145	1,050
Домінування (C)	0,091	0,109	0,110

неність філотипової структури мікробного комплексу ґрунту при застосуванні біологічної та екологічної систем землеробства, що характеризуються постійним внесенням органічної речовини, яка сприяє підтриманню на високому рівні різноманіття мікробних ценозів та активізації домінуючих форм прокаріотів ґрунту.

Таким чином, використання молекулярно-генетичних методів, зокрема tRFLP, дає можливість на новому науковому рівні оцінити бактеріальне різноманіття ґрунту, виявити нові генотипи ґрунтової мікробіоти, що не культивуються на елективних поживних середовищах, та описати філотипову структуру прокаріотичних угруповань, що формуються під посівами сільськогосподарських культур.

За результатами дослідження виявлено, що кількість філотипів прокаріотів чорнозему типового збільшується в ґрунтах при систематичному застосуванні органічної речовини у вигляді гною та рослинних решток. Філогенетичний аналіз на основі профілів tRFLP показав найбільше різноманіття домінуючих філотипів (459) при застосуванні біологічної системи землеробства. Кількість виявлених філотипів при застосуванні екологічної системи землеробства менша — 394. Застосування промислової системи негативно впливає на біорізноманіття прокаріотного комплексу чорнозему типового (101 домінуючий філотип).

Аналіз екологічних індексів еубактеріального комплексу на основі профілів tRFLP показав позитивний вплив тривалого застосування органічних речовин і систем землеробства на формування бактеріального різноманіття ґрунту.

Встановлено, що за умови застосування різних систем землеробства відбувається перерозподіл філотипів прокаріот ґрунту з утворенням різних мікробних угруповань, які різняться за структурою і домінуючими формами, та формуванням різної функціональної спрямованості мікробіологічних процесів ґрунту.

Детальне вивчення ґрунтових мікробіологічних процесів та їх спрямованості дає можливість науково обґрунтовано застосовувати агрозаходи з метою управління бактеріальною складовою для підвищення культури землеробства та збереження гомеостазу агроєкосистем.

1. Кордюм В. А., Мошинец Е. В., Цапенко М. В. и др. Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Ґрунтова мікробіологія. Ґрунтознавство. – 2008. – 9, № 1–2. – С. 53–63.
2. Андреюк К. І., Гутинська Г. О., Антупчук А. Ф. та ін. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження. – Київ: Обереги, 2001. – 240 с.
3. Думова В. А., Патыка Н. В., Круглов Ю. В., Патыка В. Ф. Изучение биоразнообразия комплекса прокаріотных микроорганизмов подзолистых почв // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 6. – С. 60–65.
4. Buckley D. H., Schmidt T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation // Microbiol. Ecol. – 2001. – 42. – P. 11–21.
5. Патыка Н. В., Круглов Ю. В., Захаренко А. В. и др. Агроэкологическая оценка дерново-подзолистых почв при возделывании льна-долгунца // Вісн. аграр. науки. – 2008. – № 7. – С. 46–50.
6. Патыка Н. В., Круглов Ю. В., Тихонович И. А., Патыка В. Ф. Профиль полиморфизма длин рестриционных фрагментов (tRFLP) комплекса прокаріотных микроорганизмов подзолистых почв // Доп. НАН України – 2009. – № 1. – С. 187–192.
7. Michel Jr., Marsh T. L., Reddy C. A. Characterization of microbial community structure during composting using analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes // Microbiol. Composting. – Heidelberg: Springer, 2002. – P. 25–42.
8. Танчик С. П. No-till і не тільки. Сучасні системи землеробства. – Київ: Юнівест медіа, 2009. – 160 с.
9. Duarte G. F., Rosado A. S., Seldin L. et al. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community // J. Microbiol. Methods. – 1998. – 32. – P. 21–29.

10. *Moreira D.* Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // *Nucl. Acids Res.* – 1998. – **26**, No 13. – P. 3309–3310.
11. *Одум Ю.* Основы экологии / Под ред. Н. П. Наумова. – Москва: Мир, 1975. – 733 с.

Національний університет біоресурсів
і природокористування України, Київ
ДНУ Всеросійський науково-дослідний
інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН,
Санкт-Петербург, Пушкін, Росія
Інститут садівництва НААН України, Київ

Надійшло до редакції 28.03.2012

Н. В. Патыка, член-корреспондент НААН України **С. П. Танчик**,
А. Ю. Колодязный, **Н. Ф. Иванюк**, **Ю. В. Круглов**,
член-корреспондент НААН України **М. Д. Мельничук**, **Т. И. Патыка**

Формирование биоразнообразия и филотипической структуры еубактериального комплекса чернозема типичного при выращивании озимой пшеницы

Проведен сравнительный филогенетический анализ 16S рРНК еубактериального комплекса чернозема типичного, сформировавшегося под влиянием различных систем земледелия при выращивании озимой пшеницы. Показана существенная разница влияния систем возделывания на формирование доминирующих филотипов и структуру их распределения. Установлено, что филогенетическое разнообразие почвенных микроорганизмов существенно зависит от направленности почвенных процессов при аграрном использовании.

N. V. Patyka, Corresponding Member of the NAAS of Ukraine **S. P. Tanchik**,
A. Yu. Kolodjzhny, **N. F. Ivanyuk**, **Yu. V. Kruglov**,
Corresponding Member of the NAAS of Ukraine **M. D. Melnychuk**, **T. I. Patyka**

Formation of biodiversity and phylotypical structure of eubacterial chernozem complex at the winter wheat growing

A comparative phylogenetic analysis of 16S rRNA eubacterial complex of typical chernozem formed under the influence of different farming systems in the cultivation of winter wheat is performed. Significant differences between farming systems in the formation of dominant genotypes and their structure are shown. It is established that the phylogenetic diversity of soil microorganisms depends essentially on the direction of soil processes in agricultural use.