



УДК 631.461:631.445.4

ОЦІНКА ПОЛІМОРФІЗМУ ПРОКАРІОТНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМІВ ТИПОВИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ

М.В. Патика, доктор сільськогосподарських наук
О.Л. Тонха, кандидат сільськогосподарських наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено прокаріотний комплекс чорнозему типового Українського степового природного заповідника (відділення "Михайлівська цілина") за допомогою молекулярно-генетичних методів. Розорювання цілинних чорноземів сприяє збідненню генетичних ресурсів мікрофлори ґрунтів і корінній зміні її якісного складу. Молекулярно-генетичний аналіз їх складу показав переважне домінування на абсолютній цілині мікроорганізмів, які не можливо виявити класичними мікробіологічними методами.

Вступ. Ґрунтові мікроорганізми виконують найважливіші функції трансформації речовин і енергії. Домінуюча частина мікробних угруповань в ґрунті представлена складним комплексом різних морфотипов і фізіологічних груп. Загальноприйнята ґрунтова мікробіологія у переважній більшості досліджує мікроорганізми, які культивуються на елективних поживних середовищах. Для кількісної оцінки біологічної активності ґрунтів, як правило, використовуються такі показники як мікробна біомаса, кількість виділеного вуглекислого газу (дихання ґрунту) та ін. Разом з тим, дослідженнями зарубіжних вчених [1, 3] доведено, що ці методи інформаційно обмежені щодо структури мікробних груп. Те ж саме можна сказати відносно аналізу мікробоценозу, за якого використовується метод "стекла обростання".

За минуле десятиліття в біологічних дослідженнях широкий розвиток отримали молекулярні методи, за допомогою яких з'явилася можливість подолати проблеми, що виникають в практиці застосування класичних мікробіологічних методів. За різними оцінками в даний час ідентифіковано не більше 10% ґрунтових мікроорганізмів. Наприклад, кількісна оцінка бактерій показала, що їх налічується більше 4000 різновидів (біоваріантів) у 30 г ґрунту і це свідчить про складність і важливість вивчення всіх компонентів природних співтовариств [1–3].

На сьогоднішній день багато робіт базується на дослідженнях нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) різних ґрунтів, які безпосередньо вилучаються із зразків [3, 4]. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з відповідними праймерами (16S рРНК, 18S рРНК та ін.) є



можливість подальшого розвитку досліджень різноманітних ізолятів і некультивованих видів мікробних співтовариств біогеоценозів [5,6]. Слід зазначити, що порівняльний аналіз природних мікробних співтовариств сприяє вивченню їх структурно-функціональних особливостей, враховуючи специфічність мікроорганізмів у певних умовах [7].

Метою наших досліджень було вивчення молекулярно-генетичними методами мікробного біорізноманіття цілинних і освоєних чорноземних ґрунтів та його зміни під впливом обробітку, а також оцінка біомаси за кількістю тотальної ДНК ґрунтових організмів.

Умови та методика досліджень. Дослідження проводилися на чорноземних типових середньосуглинкових Українського природного степового заповідника "Михайлівська цілина" (Сумська область, Лебединський район), відділення якого знаходиться в межах північно-західної підпровінції лівобережної високої провінції Лісостепової зони чорноземів типових та сірих опідзолених ґрунтів. Зразки ґрунтів для досліджень було відібрано з цілинної ділянки заповідника (абсолютна цілина) і в полі № 4 польової сівозміни (рілля з 1936 року) КСП "Червона Зірка" Лебединського району Сумської області.

ґрунтово-біологічні дослідження проводились у період активної вегетації рослин (травень 2010 р.) у 0–5-, 5–20-, 20–40-см шарах. Відбір, підготовка та зберігання зразків ґрунту для дослідження аеробної мікробіоти в лабораторних умовах проводили згідно ДСТУ ISO10381 - 6:2001.

Відпрацьовано оригінальну методику екстракції тотальної ДНК мікроорганізмів, в основу якої було покладено методи [8, 10]. Електрофоретичне розділення одержаних зразків ДНК (рис. 1) проводили в 1% агарозному гелі. Візуальну де-

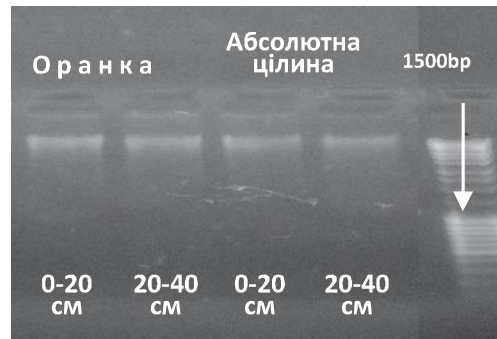


Рис. 1. Електрофореграма тотальної ДНК ґрунтових організмів. Маркер молекулярних мас – 1500 bp

текцію зразків ДНК і очищення ґрунтової ДНК від домішок гумінових кислот здійснювали за методом [9]. Кількість тотальної ДНК ґрунтових організмів вимірювали спектрофотометрично в спектрофотометрі "Beckman" (США).

ПЛР 16S рРНК (рис. 2) з використанням тотальної ДНК ґрунтових організмів проводили флуоресцентно-міченими праймерами Eu3. Рестрикція отриманих ампліконів проводилась за допомогою синтетичних ендонуклеаз (Hae III, Msp I).

Секвенування отриманих клонуваних фрагментів 16S рРНК виконували в автоматичному капілярному секвенаторі CEQ 8000 Genetic Analysis System ("Beckman Coulter", США), згідно з рекомендаціями виробника. Визначали інтенсивність флуоресценції термінального

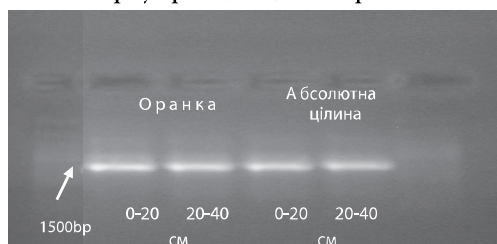


Рис. 2. Електрофореграма ампліфікації 16S рРНК тотальної ДНК ґрунтових організмів з флуоресцентно міченим праймером. Маркер молекулярних мас – 1500 bp

фрагмента і будували пік, який був пропорційний кількості ДНК й відповідав геному кожної таксономічної одиниці в зразку. Для видової класифікації фрагментів tRFLP використовували програму TRFLP Fragsort. Крім цього аналізували нуклеотидні послідовності та перевіряли їх ідентичність з відповідними послідовностями 16S рРНК (база даних GenBank). Аналіз результатів секвенування здійснювали за допомогою програми Vector NTI Advance. Екологічні параметри розраховувались за методикою [11]. Статистичну обробку даних проводили з використанням комп'ютерних програм з пакету Excel.

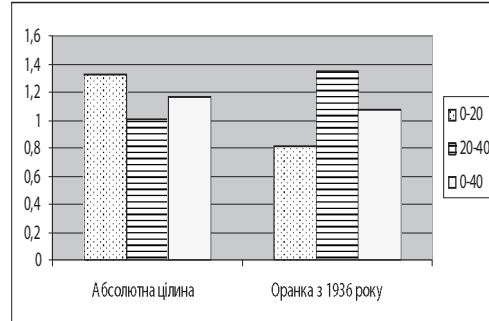


Рис. 3. Кількість тотальної ДНК ґрунтових організмів в чорноземі типовому на варіанти абсолютної цілини і оранки

Результати досліджень та їх обговорення. Результати аналізу кількості тотальної ДНК ґрунтових організмів у ціло-

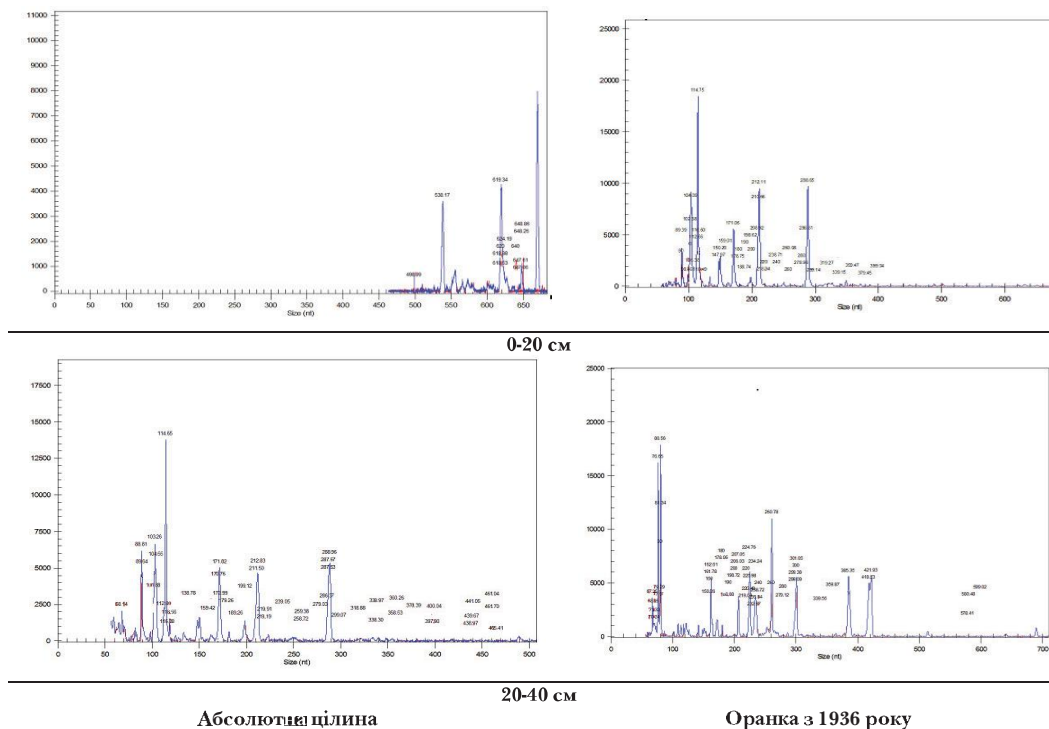


Рис. 4. Генетичне різноманіття прокаріот в чорноземах типових природного заповідника "Михайлівська цілина" в абсолютній цілині і при застосуванні оранки (профіль tRFLP рестриктаза *NotI*: на осі ординат – розмір термінальних фрагментів в діапазоні 60-700 nt (пар нуклеотидів), на осі абсцис – інтенсивність флуоресценції)



му співпадають з уявленнями, отриманими традиційними методами при аналізі ґрунтової мікрофлори. На рис. 2 наведено електрофореграму ампліфікації 16S рРНК отриманих з тотальної ґрунтової ДНК у варіантах абсолютної цілини і оранки.

Кількість тотальної ДНК ґрунтових організмів у чорноземах варіанту абсолютної цілини (рис. 3) природного заповідника "Михайлівська цілина" була високою як у верхньому кореневмісному 0–20 см, так і в 0–40 см шарі ґрунту і свідчить про більш різноманітні й складні трофічні взаємозв'язки та кількість біомаси ґрунтових організмів на природному не порушеному фоні функціонування фітоценозу. Оранка призводить до зміни фізико-хімічних показників та зменшення кількості надходження свіжої органічної речовини у верхній 0–20 см шар чорноземів типових Михайлівської цілини, що збіднює біорізноманіття ґрунтових організмів.

Разом з тим, у шарі 20–40 см на оранці отримано вищі показники кількості тотальної ґрунтової ДНК, що пов'язано із обертанням скиби та надходженням в нижній шар рослинних решток і добрив. У середньому розорювання цілинних ґрунтів призвело до зменшення біорізноманіття прокаріотів у шарі 0–40 см.

Аналіз поліморфізму прокаріотного комплексу чорноземів природного заповідника "Михайлівська цілина" (рис. 4) профілів отриманих за допомогою методу tRFLP, виявив зменшення біорізноманіття бактеріального комплексу ґрунту за його використання в ріллі. У варіанті абсолютної цілини в шарі 0–20 см формуються більш концентровані високомолекулярні фрагменти від 450 до 700 nt пар нуклеотидів, порівняно з 70–400 nt на оранці.

Філогенетичний аналіз дендрограм, побудованих на основі отриманих даних профілів методом tRFLP, свідчить про більше і складніше філотипове різнома-

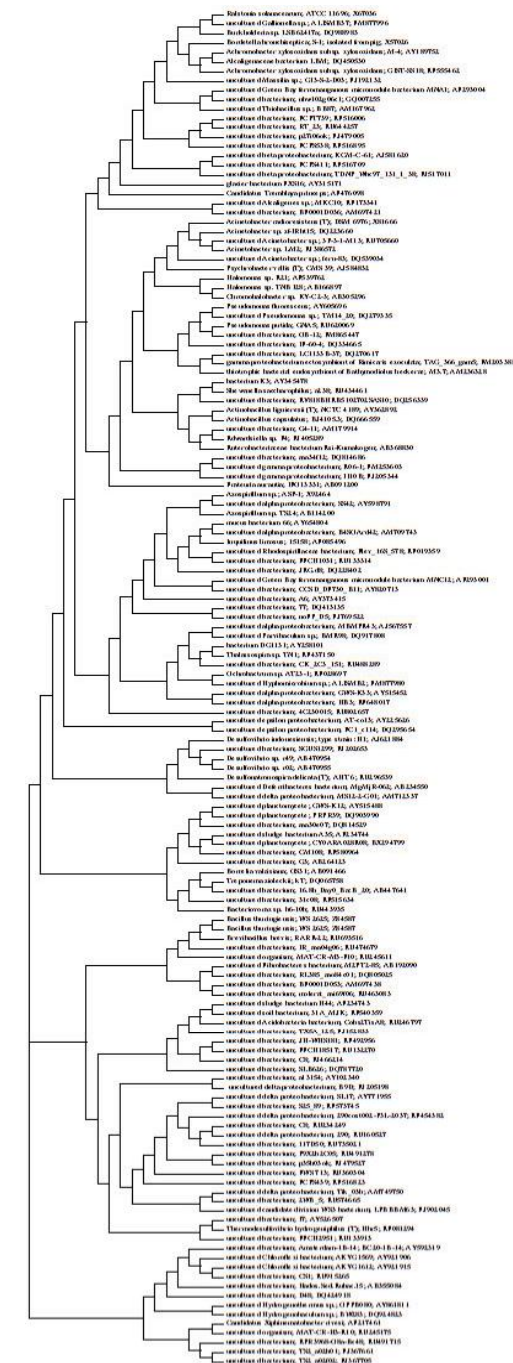


Рис. 5. Генетична різноманітність прокаріотних генотипів в чорноземах типових на абсолютній цілині

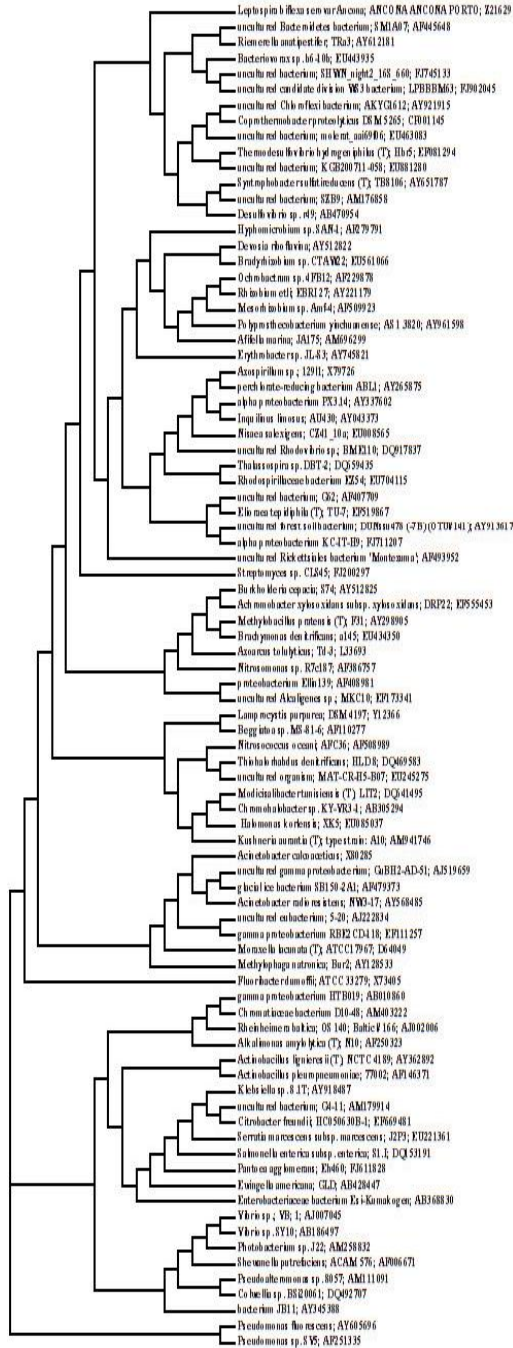


Рис. 6. Генетичне різноманіття філотипів прокаріот у чорноземх типових при застосуванні оранки

ніття ґрунтових мікроорганізмів на абсолютній цілині. Топологія розподілу прокаріотних 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% некультивованих. У варіанті з оранкою дендрограма (рис. 6) складається із восьми основних кластерів 52 родів, 17% некультивованих.

Як на абсолютній цілині, так і на оранці спостерігались роди мікроорганізмів, що приймають участь у кругообігу основних елементів живлення (нітрогену, фосфору, калію, сульфуру, карбону та ін.): *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Azospirillum*, *Thalassospira*, *Ochrobactrum*, *Desulfovibrio*, *Ralstonia*, *Nitrosomonas*, *Beggiatoa*, *Streptotomyces*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Alkalimonas*, *Actinobaculum*, *Citrobacter*, *Verrucomicrobium*, *Pantoea*, *Rhizobium*.

Крім того, абсолютна цілина характеризувалася наявністю родів, які не було виявлено на оранці: *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Bordetella*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Candidatus Hepatoplasma*, *Psychrobacter*, *Chromohalobacter*, *Candidobacterium*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Zoogloea*, *Mycoplasma*, *Rhodospirillum*, *Rhodospira*, *Desulfospira*, *Borrelia*, *Bacteriovorax*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Thermodesulfobivrio*, *Mesorhizobium*, *Thiomonas*. На оранці були у наявності інші роди: *Leptospira*, *Riemerella*, *Bacteriovorax*, *Coprorhombacter*, *Thermodesulfobivrio*, *Syntrophobacter*, *Hyphomicrobium*, *Prostheobacterium*, *Erythrobacter*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Methanohalobium*, *Lactobacillus*, *Azoarcus*, *Lamprocystis*, *Nitrosococcus*, *Thiohalomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Sphingomonas*, *Moraxella*, *Methylophaga*, *Legionella*, *Pseudoalteromonas*, *Serratia*, *Salmonella*, *Ewingella*, *Vibrio*; *Photobacterium*; *Colwellia*.

Дослідженнями встановлено, що як на абсолютній цілині, так і на оранці



сформувалися мікробоценози, домінуюче положення в яких зайняли різні види бактерій (табл. 1). Молекулярно-генетичний аналіз складу цих угруповань у варіанті з абсолютною цілиною виявив численне домінування представників філогенетичних груп *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Bacterium*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Actinobaculum*. Відсоток траплянь *Pseudomonas* та *Bacillus* склав від 4 до 8%, проте некультивовані види бактерій становили 68%. На оранці домінували представники *Actinobacteria*, *Vibrio*, *Actinobaculum*, *Proteobacterium*, *Achromobacter* – 6 %, а некультивовані види бактерій склали 17%. Саме цей список домінантів є одним із репрезентативних показників таксономічної структури мікробних комплексів агроєкосистем, що свідчить про функціональну спрямованість формування ґрунту і процесів, які в ньому відбуваються.

Бактерії роду *Pseudomonas* являють собою велику гетерогенну групу широко розповсюджених у біосфері мікроорганізмів, біологічна роль яких реалізується, перш за все, в процесах мінералізації органічних сполук [12]. Більша кількість бактерій роду *Pseudomonas* спостеріга-

лась у варіанті з абсолютною цілиною, порівняно з оранкою. Це пов'язане з більшою біомасою рослинних решток, що надходять у ґрунт.

Мікроорганізми можуть бути джерелом накопичення в ґрунті токсичних речовин. Провідна роль у цьому належить представникам родів *Bacillus* і *Pseudomonas*. Найбільш помітний фітотоксичний вплив спричиняли *B. amilosa*, *B. brevis* і *Pseudomonas fluorescens* та деякі інші [13]. На оранці, порівняно з абсолютною цілиною, було зафіксовано види, які мають можливість синтезу фітотоксичних речовин. Абсолютна цілина, у зв'язку з біорізноманіттям рослинних асоціацій, характеризувалася наявністю видів бактерій-деструкторів рослинних решток та відсутністю представників, що здійснюють фітотоксичний вплив.

Багато представників роду *Achromobacter* утворюють колоїдні слизи і здатні цементувати ґрунтові агрегати. Їх структура недовговічна й відносно легко розпадається. Кількість бактерій цього роду була вищою в 4 рази у варіанті абсолютної цілини, де переважали також бактерії класу *Alfaproteobacteria* (роди *Azospirillum*, *Acetobacter*). Останні відіграють важ-

Таблиця 1. Вплив розорювання цілини на склад домінуючих родів бактерій в чорноземах типових, % траплянь бактерій

Рід бактерій	Абсолютна цілина	Оранка
<i>Pseudomonas</i>	6,6	4,4
<i>Acetobacter</i>	8,4	4,4
<i>Proteobacterium</i>	4,4	8,4
<i>Desulfovibrio</i>	8,8	1,5
<i>Achromobacter</i>	8,8	1,5
<i>Halomonas</i>	6,6	1,5
<i>Bacillus</i>	4,4	-
<i>Azospirillum</i>	4,4	1,5
<i>Actinobaculum</i>	4,4	5,9
<i>Vibrio</i>	-	3,0
<i>Uncultured bacterium</i>	68	17



Таблиця 2. Екологічна оцінка чорнозему типового «Михайлівської цілини»

Варіант	Шар ґрунту, см	Екологічні індекси	
		домінування	різноманіття
Оранка	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

ливу роль у кругообігу азоту в природі, зв'язуючи недоступний рослинам атмосферний азот та виділяючи його в ґрунт у вигляді йонів амонію.

Наявність лише однієї сільськогосподарської культури порушує функціонування природних мікробоценозів і в ґрунті відновлюються процеси саморегуляції, збереження метаболітичної активності в несприятливих умовах навколишньої середовища. Такою властивістю наділяють ґрунт бактерії *Actinobaculum* і *Vibrio*, кількість яких переважала на оранці.

Оцінку екологічних параметрів прокаріотного ґрунтового комплексу з врахуванням екологічних індексів домінування та різноманіття наведено у табл. 2.

Таким чином, порівняльний аналіз методів tRFLP і клонування тотальної ґрунтової ДНК дав можливість провести ідентифікацію ґрунтових прокаріотів і виявити вплив вживаних агротехнічних заходів на домінуючі види ґрунтових прокаріотів. Водночас, отримані результати підтверджують те, що основні групи мікроорганізмів зустрічаються на обох варіантах дослідження.

Висновки

Молекулярно-генетичний аналіз складу мікробних ценозів чорноземів Михайлівської цілини виявив численне домінування некультивованих на селективних середовищах видів бактерій у варіанті абсолютна цілина (до 68%) у порівнянні з оранкою (до 17%).

У чорноземах типових Михайлівської цілини у варіантах як абсолютної цілини, так і оранки, сформувалися мікробоценози, де домінуючу позицію зайняли різні види бактерій.

Розорювання цілинних чорноземів зменшує генетичні ресурси мікрофлори ґрунтів (145 видів у варіанті абсолютної цілини, 86 – на оранці) і спричинює корінну зміну її якісного складу. У варіанті абсолютної цілини виявлено 13 основних кластерів, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 44 родів. На оранці мікробний комплекс складається з 8 кластерів і 52 родів, домінуючими представниками яких є види, що відповідають за відновлення ґрунтової родючості.

Література

1. Buckley D.H., Schmidt T.M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation // *Microbial Ecology*. – 2001. – **42**. – P. 11–21.
2. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L. High diversity in DNA of soil bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – **56**. – P. 782–787.
3. Boone D.R., Castenholz R.W., Springer-Verlag N.Y. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – [2nd. ed.]. – Berlin, Heidelberg, 2001. – V.1.
4. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes /A. Felske, A. Wolterink, R. Van Lis et al // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – **66**. – P. 3998–4003.



5. Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. – 1998. – P. 173-198.
6. Marsh T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – **2**. – P. 323–327.
7. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM-analyses / F. Widmer, A. Fliessbach, E. Laczko et al // *Soil Biology & Biochemistry.* – 2001. – **33**. – P. 1029–1036.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* – 1987. – **12**. – P. 13–15.
9. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // *Nucleic Acids Research.* – 1998. – **26**, № 13. – P. 3309–3310.
10. Black-Madison C.A. *Methods of soil analysis.* - Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. – 1984. – Band 2. – 1159 p.
11. Одум Ю. Экология. – М.: Мир, 1986. – Т.1. – 325 с.
12. www.imiamn.org/journal.htm Волянська Н.П. Загальнобіологічна роль бактерій роду *Pseudomonas* в природі, їх клінічна значущість та чутливість до антибіотиків.
13. Берестецький О.А. Фитотоксини почвенных микроорганизмов и их экологическая роль // *Фитотоксические свойства почвенных микроорганизмов.* – Л., 1978. – С. 7–30.

АННОТАЦІЯ

Пати́ка М.В., Тонха О.Л. Оцінка прокаріотного комплексу чорноземів типових молекулярно-генетическими методами // Біоресурси і природопольовання. – 2012. – 4, № 1–2. – С. 58–65.

Исследован прокаріотический комплекс чернозема типичного Украинского степного в естественном заповеднике (отделение "Михайловская целина") с помощью молекулярно-генетических методов. Распахивание целинных черноземов приводит к обеднению генетических ресурсов микрофлоры почв и коренному изменению ее качественного состава. Молекулярно-генетический анализ их состава в варианте абсолютной целины показал доминирование некультивированных на селективных средах видов бактерий, которые не обнаруживаются классическими микробиологическими методами.

SUMMARY

M. Patyka, O. Tonkha. Estimation of prokaryotic complex in typical chernozem by molecular-genetic methods // Biological Resources and Nature Management. – 2012. – 4, № 1–2. – P. 58–65.

The molecular-genetic estimation of prokaryotic complex in typical chernozem of Ukrainian steppe natural reservation ("Mikhaylyuska tsylina" division) has been conducted. Researches have shown that plowing out of virgin typical chernozem leads to impoverishing of genetic resources of soil microflora and basic change of its quality composition. Molecular-genetic analysis of microbial composition has shown the prevailing of uncultivated in selective environments microorganisms which are not revealed by classical microbiological methods in absolute virgin soil plot comparing with plowing plot.