

УДК 579.64:631.427

**О.Ю. Колодяжний, аспірант**

*НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ*

**Є.Є. Андронов, кандидат біологічних наук**

*ДНУ ВСЕРОСІЙСЬКИЙ НДІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ РАСГН*

**М.В. Патика, доктор сільськогосподарських наук**

*ННЦ «ІНСТИТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА НААН»*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНЕ ОЦІНЮВАННЯ ПРОКАРІОТНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМУ ТИПОВОГО ЗА ВИРОЩУВАННЯ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ**

Ґрунт є важливим природним самовідновлюваним ресурсом та середовищем, в якому формується біологічне різноманіття живих організмів, а мікроорганізми – основним джерелом генетичного різноманіття ґрунтової біоти. Встановлено, що число різних геномів прокаріот в одному грамі ґрунту варіює в діапазоні від 2000 до 18000 [4]. Структура та гетерогенність обумовлює високу мікророзональність ґрунту, в якому формуються мікробні ценози та їх системи, що безпосередньо впливає на їх функціональну різнонаправленість [9].

Більш ніж 95 % прокаріот потребують комплексної оцінки структури якісного складу, складних трофічних зв'язків, механізмів взаємодії між мікробними ценозами та середовищем їх існування в системі ґрунт – мікроорганізми – рослина [3]. За різними оцінками, класичними мікробіологічними методами дослідження можливо врахувати від 0,1 до 10 % мікробного фонду ґрунту. На фоні невідомих та видів, що не культивуються, відповідно до цього недостатньо дослідженого пулу мікробних генів та генних продуктів, функції більшості мікроорганізмів залишаються нез'ясованими [2].

За останнє десятиліття значного розвитку набули молекулярно-біологічні методи дослідження, що лягли в основу нових відкриттів у мікробіології – напрямку метагеноміки [7]. Сучасні роботи з вивчення структури ендоґрунтової мікрофлори базуються на виділенні нуклеїнових кислот (рДНК та рРНК) всіх живих організмів із різних типів ґрунтів та подальшому їх аналізі [11].

З розвитком у молекулярній мікробіології методів секвенування нового покоління (піросеквенування) розширились можливості масштабного вивчення мікробіоти. Такий підхід дозволяє виявляти реальне таксономічне різноманіття компонентів ґрунтового мікріоому, незалежно від функціональної спрямованості, трофізму та культивування на поживних середовищах [5].

© О.Ю. Колодяжний, Є.Є. Андронов, М.В. Патика, 2014

**Мета статті:** оцінити метагеном та таксономічну структуру прокаріотного комплексу чорнозему типового за вирощування пшениці озимої в умовах різних систем землеробства.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження прокаріот чорнозему типового проводили у фазі цвітіння пшениці озимої з верхнього кореневмісного шару (0 – 20 см) в стаціонарному польовому досліді, закладеному на базі кафедри землеробства та гербології НУБіП України у 2012 – 2014 роках. Зміст досліду передбачав поєднання трьох градаційних систем землеробства на фоні диференційованого та поверхневого основного обробітку ґрунту. Системи землеробства відрізняються рівнем ресурсного забезпечення елементами живлення сільськогосподарських культур для бездефіцитного потенціалу агроландшафту. За промислової системи землеробства (контроль) на гектар ріллі в сівозміні вносили 12 т органічних і 300 кг мінеральних добрив ( $N_{92}P_{100}K_{108}$ ). У екологічній моделі пріоритетним є застосування органічних добрив у кількості 24 т/га (12 т/га гною, 6 т/га нетоварної, побічної частини врожаю с.-г. культур, 6 т/га сидеральної маси пожнивних посівів). Баланс елементів живлення компенсували мінеральними добривами ( $N_{46}P_{49}K_{35}$ ). Індекс екологізації становив 6,2, що є підставою до класифікації цих систем як складової частини екологічного землеробства. Основою біологічної системи є внесення 24 т/га ріллі органічних добрив в сівозміні без хімічно синтезованих агрохімікатів із застосуванням біологічних засобів захисту посівів[6].

Для аналізу метагеному та таксономічної структури прокаріот чорнозему типового застосовували метод піросеквенування [10], що включав наступні етапи:

- виділення тотальної ДНК ґрунтових організмів, її очищення від гумінових кислот проводили згідно методичних рекомендацій [1];
- збільшення кількості бактеріального фрагменту гену 16S рРНК проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler T100 (Bio-Rad) із використанням універсальних праймерів F515 GTGCCAGCM-GCCGCGGTAА і R806 GGACTACVSGGGTATCTAАТ з додаванням олігонуклеотидних ідентифікаторів (MID) для кожної проби і послідовностей, необхідних для піросеквенування по протоколу Roche [5];
- підготовку проб, емульсійну ПЛР і секвенування проводили на приладі GS Junior (Roche, USA) згідно з методичними рекомендаціями виробника;

- аналіз ампліконних бібліотек гена 16S рРНК здійснювали за допомогою програмного модуля QIIME (версії 1.7.0.), що включав видалення з масиву даних стандартних послідовностей і праймерів; фільтрацію сиквенсів на якість, вирівнювання нуклеотидних послідовностей; проведення вибору та класифікацію послідовностей на відповідність ОТО (Операційна таксономічна одиниця) з використанням критерію 97 % подібності; визначення таксономічної структури мікробних комплексів та їх порівняльний аналіз; обчислення індексів різноманіття Шеннона та насиченості ChaoI (порівняння передбаченої кількості ОТО за відповідних параметрів вибірки з кількістю експериментально виявлених у зразках), які дозволяють судити про рівень біорізноманіття та повноту його аналізу [8].

**Результати дослідження.** За результатами піросеквенування біому прокаріотного комплексу чорнозему типового, після проходження тесту на якість, для метагеномного аналізу відібрано 20417 нуклеотидних послідовностей із середньою довжиною 252,5 ± 0,02 пар нуклеотидів. Їх кількість у пробах варіювала від 2941 за біологічної системи з диференційованим обробітком до 3792 за екологічної з поверхневим обробітком ґрунту (табл. 1).

**Таблиця 1. Технічні та екологічні показники різноманіття прокаріот чорнозему типового за різних систем землеробства, 2012 – 2013 рр.**

Варіант		Кількість сиквенсів, шт.	Кількість ОТО, шт.	Індекс ChaoI	Індекс Шеннона
Промислова система	Диференційований обробіток	3252	238	1355,48	4,54
	Поверхневий обробіток	3441	223	1035,56	3,55
Екологічна система	Диференційований обробіток	3278	284	1296,84	4,17
	Поверхневий обробіток	3792	324	1138,17	4,13
Біологічна система	Диференційований обробіток	2941	216	1207,55	3,74
	Поверхневий обробіток	3713	333	1344,06	4,09

Рівень біорізноманіття прокаріот ґрунту був досить високим. Загалом у метагеномі чорнозему типового виявлено 1708 ОТО, що відповідали 335 таксонам прокаріот, з яких 67 % були ідентифіковані на рівні родини та 33 % – до роду. При цьому мала місце значна кількість некласифікованих послідовностей, частка яких складала від 8,5 до 13,5 % залежно від варіантів.

Індекси різноманіття Шеннона визначено в межах 3,55 – 4,54, що свідчить про високий ступінь різнонаправленості ґрунтового-мікробіологічних процесів, які сприяють формуванню відповідного поліморфізму прокаріот чорнозему типового. Індекси насиченості ChaoI перевищували кількість виявлених ОТО в 3,5 – 5,7 разів залежно від варіантів досліджу. Це вказує на те, що рівень реального біорізноманіття прокаріот чорнозему типового в рази перевищує експериментально виявлений.

Таксономічний аналіз нуклеотидних послідовностей показав наявність у структурі мікробіому чорнозему типового представників прокаріот двох архейних (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*) та 22 бактеріальних філ (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *BRC1*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *OD1*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *TM7*, *Thermi*, *Verrucomicrobia*, *WS3*, *WYO*). Абсолютними домінантами за насиченістю від загальної кількості виявлених філотипів прокаріот були представники *Proteobacteria* – 79,6 % та *Actinobacteria* – 12,9 % .

Топологія розподілу представників мікробного ценозу за варіантами досліджу переважно характеризувалась зміною співвідношення основних бактеріальних таксонів. Так, на рівні великих таксономічних одиниць (філ) значної диференціації абсолютних домінантів за варіантами досліджу не спостерігали. Таксономічний аналіз на рівні родин дозволив виявити структуру розподілу основних представників прокаріотного комплексу чорнозему типового. Домінуючими були родини *Alcaligenaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Solirubrobacteraceae*, *Gaiellaceae*, *Nitrososphaeraceae* (рис. 1). При цьому частка представників родини *Alcaligenaceae* за екологічної системи землеробства знижувалась та становила 40,4 та 39,8 % відповідно до обробітку ґрунту, а представленість *Pseudomonadaceae* навпаки зростала, порівняно з іншими системами.

Родини прокаріот *Gaiellaceae* та *Solirubrobacteraceae* найбільш представлено за промислової системи землеробства з диференційованим обробітком – 3,6 та 1,8 % відповідно.

Більш варіабельний розподіл за варіантами досліджу спостерігали серед субдомінуючих представників мікробіому (рис. 2).

Так представленість родини *Micrococcaceae* та *Hyphomicrobiaceae* за екологічної системи була в 1,6 рази вищою, ніж за промислової з диференційованим обробітком, родини *Intrasporangiaceae* – в 1,5 – 2,0 рази, родини *Streptomyetaceae* – в 1,5 нижчою, порівняно з

іншими варіантами. За біологічної системи землеробства виявлено зниження представників *Nocardioideaceae* майже у 2 рази, *Intrasporangiaceae* – в 3,5 за поверхневого та 5,7 раз за диференційованого обробітку. У варіантах з пріоритетним застосуванням органічних добрив зростала кількість представників родин *Xanthomonadaceae*, *Comamonadaceae* та відбувалось зменшення частки представників *Sinobacteraceae* та *Bacillaceae*. За поверхневого обробітку ґрунту представленість родини *Pseudonocardiaceae* зменшувалась, а *Geodermatophilaceae* збільшувалась, зокрема, у варіантах промислової і екологічної моделей землеробства.

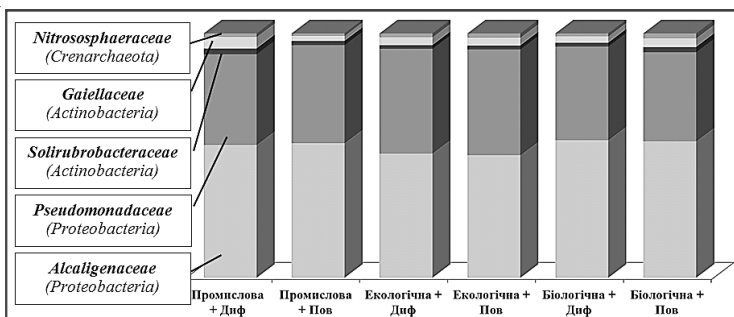


Рис. 1. Структура розподілу домінуючих прокаріот чорнозему типового за різних систем землеробства

Примітка: Диф. – диференційований обробіток;  
Пов. – поверхневий обробіток.

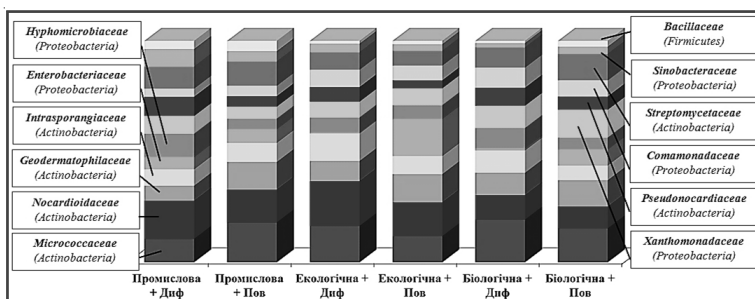


Рис. 2. Структура розподілу субдомінуючих прокаріот чорнозему типового за різних систем землеробства

Примітка: Диф. – диференційований обробіток;  
Пов. – поверхневий обробіток.

Слід зазначити, що значне збільшення представленості родини *Enterobacteriaceae* спостерігали у варіанті екологічної системи землеробства з поверхневим обробітком ґрунту. Це пояснюється ймовірним їх надходженням у ґрунт з органічними добривами (гноєм). За екологічної та біологічної систем з диференційованим обробітком відсоток їхньої представленості був найменший.

Варто наголосити, що частка мінорних видів прокариотного комплексу, представленість кожного з яких не перевищувала 0,1 %, у сумі складала – 16,3 – 25,2 % залежно від варіанту досліду, що визначає їх важливу роль у формуванні загального біорізноманіття мікробного комплексу. Тому присутність цих мінорних груп необхідно враховувати при характеристиці мікробіому в цілому та визначенні функціональної спрямованості мікробних ґрунтових процесів.

*Висновки.* Таким чином, застосування методу піросеквенування дало можливість на новому рівні оцінити мікробіом чорнозему типового, провести аналіз структури та якісний склад, оцінити його кількісні характеристики, виявити нові філотипи ґрунтової мікробіоти, що не культивуються на поживних елективних середовищах.

Установлено, що абсолютними домінантами в структурі прокариотного комплексу чорнозему типового в агроценозі пшениці є представники бактеріальних філ *Proteobacteria* – 79,6%, та *Actinobacteria* – 12,9%, зокрема родини: *Alcaligenaceae*, та *Pseudomonadaceae*. Значно менше представлені філи *Gemmatimonadetes* – 1,4%, *Chloroflexi* – 1,4%, *Acidobacteria* – 1,0%, *Firmicutes* – 0,7%, *Planctomycetes* – 0,4%, *Verrucomicrobia* – 0,4% та *Bacteroidetes* – 0,2 %. Високий рівень біорізноманіття прокариот обумовлено наявністю мінорних філотипів різних таксонів, представленість яких у мікробіомі була дуже низькою, а їх кількість перевищувала сотні штук.

За різних систем землеробства відбувається формування мікробних угруповань з різним рівнем диференціації структури та представленості домінуючих та субдомінуючих таксонів прокариот чорнозему типового, що обумовлено різною функціональною направленістю мікробних процесів у ґрунті.

1. Андронов Е.Е. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды / Е.Е. Андронов [и др.] – ГНУ ВНИИСХМ, 2011 – 27 с.

2. Пати́ка М.В. Формування біорізноманіття та філотипової структури еубактеріального комплексу чорнозему типового при вирощуванні пшениці озимої / М.В. Пати́ка, С.П. Танчик, О.Ю. Колодажний [та ін.] // Доповіді НАН України. – 2012. – № 11. – С.163-171.
3. Пати́ка Н.В. Агробиология микроорганизмов: разнообразие, структурная организация и функциональные особенности / Н.В. Пати́ка, В.Ф. Пати́ка // Імунологія та алергологія: наука і практика. – 2014. – Додаток № 1. – С. 77-78.
4. Пати́ка Н.В. Прокаріотические микроорганизмы почвы: структура и функциональное разнообразие / Н.В. Пати́ка, Ю.В. Круглов, Е.В. Шеин // Тезиси докладов XIII Съезда общества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского. – Одесса, 2013. – С. 46.
5. Першина Е. Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования / Е. Першина, Г. Тамазян, А. Дольник [и др.] // Экологическая генетика – 2012. – Т. 10. – №2. – С. 31 – 38.
6. Танчик С.П. Екологічна система землеробства в Лісостепу України. Методичні рекомендації для впровадження у виробництво / С.П. Танчик, О.А. Демідов, Ю.П. Манько [та ін.]. – К: НУБіП України, 2011. – 39 с.
7. Green Tringe S. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples/ S. Green Tringe, E. M. Rubin// Nature reviews: Genetics. – Nature Publishing Group, 2005. – Vol. 6. – P. 805 – 814.
8. Kuczynski J. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities / J. Kuczynski, J. Stombaugh, W. Anton Walters [et all] // Curr Protoc Bioinformatics – 2012. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249058/>.
9. Microbial diversity and soil functions / P. Nannipieri, J. Ascher, M. T. Ceccherini [et al]// European Journal of Soil Science. – 2003. – Vol. 54. – P. 655 – 670.
10. Ronaghi M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis / M. Ronaghi // Methods Mol. Biol. – 2004. – V. 255. – P. 211–219.
11. Uroz S. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. / S. Uroz, M. Buee, C. Murat [et all] / Environ. Microbiol. – 2010. – №. 2. – P. 281–288.

Методом піросеквенування проведено порівняльний аналіз метагеному та таксономічної структури прокаріот чорнозему типового в агроценозі пшениці озимої за різних систем землеробства. Виявлено представників 22 бактеріальних та двох архейних філ. Установлено, що абсолютними домінантами в структурі прокаріотного комплексу є представники бактеріальних філ *Proteobacteria* та *Actinobacteria* з різним ступенем представленості родин у варіантах досліді. Високий рівень біорізноманіття досягався за рахунок значної кількості міnorних таксономічних одиниць, сумарна частка яких склала 16,3 – 25,2 % залежно від варіантів досліді.

**Ключові слова:** мікробний комплекс, чорнозем типовий, метагеном прокариот, ґрунт, пшениця озима, піросеквенування.

С использованием метода пиросеквенирования проведен сравнительный анализ таксономической структуры прокариот чернозема типичного в агроценозе озимой пшеницы при разных системах земледелия. Выявлено представителей 22 бактериальных и двух архейных фил. Установлено, что абсолютными доминантами в структуре прокариотного комплекса были представители бактериальных фил *Proteobacteria* и *Actinobacteria* с разной степенью представленности в вариантах опыта. Высокий уровень биоразнообразия достигался за счёт большого количества минорных таксономических единиц, суммарная доля которых составила 16,3 - 25,2% в зависимости от вариантов опыта.

**Ключевые слова:** микробный комплекс, чернозём типичный, метагеном прокариот, почва, озимая пшеница, пиросеквенирование.

*The comparative analysis of taxonomic structure of chernozem's prokaryotes in agroecosystem of winter wheat with different agrarian systems was conducted by method of pyrosequencing. It would be identified representatives of 22 Bacterial and two Archaea phylums. It is established, that phylum of Proteobacteria and Actinobacteria were absolutely dominant in the structure of prokaryotic complex and had different degrees of representation of families in the experimental variants. High level of biodiversity was achieved due to a large number of minor taxonomic units, the total share of which amounted to 16,3 – 25,2 % depending on the variants of experiment.*

**Keywords:** microbial complex, typical chernozem, metagenome of prokaryotes, soil, winter wheat, pyrosequencing