

УДК 579.262: 579.8

Г.А. Иутинская¹, Л.В. Титова¹, А.Г. Пинаев², Е.Е. Андронов²,
С.В. Вознюк¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, тел.: +38(044) 526 34 79, e-mail: vozsvet@gmail.com

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»,
шоссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608, Россия,
тел.: +7 (812) 470 51 00, e-mail: eeandr@gmail.com

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОМА РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФУНГИЦИДОВ И ИНОКУЛЯЦИИ МИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТОМ ЭКОВИТАЛ

Биоразнообразие почвенных микроорганизмов в агроэкосистемах играет ключевую роль в стабилизации и сохранении плодородия почв, повышении продуктивности растений. **Цель.** Изучить разнообразие филумов микробиома темно-серой оподзоленной почвы в ризосфере сои, семена которой обработаны фунгицидами с последующей инокуляцией комплексным микробным препаратом Эковитал. **Методы.** Молекулярно-биологические методы, пиросеквенирование ПЦР-амплификатов участка V4 гена 16S рРНК. **Результаты.** В микробиоме ризосферы сои идентифицированы 20 филумов, 28 классов и 44 порядка бактерий, а также один филум, один класс и два порядка архей. Представленность филума Proteobacteria возросла с 26,2% в контрольном варианте до 35,8–37,6% в вариантах с обработкой семян фунгицидами и инокуляцией, а филумов Bacteroidetes, Firmicutes и Acidobacteria – с 1,5%, 2,1% и 11% в контрольном варианте до 3,5–5,4%, 2,6–4,7% и 12,8–13,3%, соответственно, во всех вариантах обработки. Увеличение индексов биоразнообразия (Шеннона и Менхиника) и снижение индексов доминирования (Симпсона и Бергера-Паркера) указывают на возрастание биоразнообразия в вариантах с применением комплексного инокулянта Эковитал, а также фунгицидов с Эковиталом. **Выводы.** Комплексная инокуляция и ее применение с фунгицидами способствовали увеличению биоразнообразия прокариот в ризосфере сои.

Ключевые слова: микробиом, биоразнообразие, ризосфера сои, пиросеквенирование, инокуляция, фунгициды.

Почва – одна из наиболее заселённых микроорганизмами сред обитания, в одном грамме которой содержится от 2 тыс. до 8,3 млн. бактерий [1]. Известно, что микроорганизмы почвы играют ключевую роль в почвообразовании [2], биогеохимических циклах основных биогенных элементов – углерода [3], азота [4], серы и фосфора, в утилизации отходов, а также в детоксикации поллютантов [5].

© Г.А. Иутинская, Л.В. Титова, А.Г. Пинаев, Е.Е. Андронов, С.В. Вознюк, 2017



Особый интерес представляет микробиом ризосферной почвы, непосредственно прилегающей к корням растений, которые выделяют экссудаты и привлекают микроорганизмы, за счет чего поддерживается высокий уровень биологической активности в почве корневой зоны [6].

Известно, что большинство почвенных бактерий не культивируются в лабораторных условиях [7]. Достижения современной молекулярной биологии способствовали разработке молекулярно-биологических, культурально-независимых (culture-independent) методов изучения биоразнообразия микроорганизмов почвы, основанных на исследованиях тотальной микробной ДНК – метагенома [8]. Наиболее информативным и распространённым является современный метод высокопроизводительного пиросеквенирования, который позволяет определить количественные показатели представленности таксонов, включая доминантные и минорные филумы микробиома почвы, с высокой точностью (97–99%) [9].

Изучение биоразнообразия почв агроценозов является актуальным и привлекает внимание многих исследователей. В современной земледелии интенсивно используются фунгициды, которые могут отрицательно влиять на нецелевые объекты – почвенные бактерии и нарушать экологическое равновесие. Данные о влиянии фунгицидов на разнообразие микроорганизмов почвы известны в литературе [10, 11], в то же время воздействие фунгицидов на почвенный микробиом при применении инокуляции семян мало изучено.

Целью работы было исследовать разнообразие прокариотных филумов микробиома темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои при применении фунгицидов и комплексной инокуляции.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований был микробиом ризосферы сои сорта Аннушка, выращиваемой на темно-серой оподзоленной почве. За сутки до посева, семена обрабатывали одним из фунгицидов системного и контактного действия: Максим Стар 025 FS (действующие вещества: флудиоксонил, 18,7 г/л и ципроконазол, 6,25 г/л; Syngenta, Швейцария; доза – 1 л/т семян) и Кинто дуо (действующие вещества: тритриконазол, 20 г/л и прохлораз, 60 г/л; BASF, Швейцария; доза – 1 л/т семян) согласно рекомендациям производителей. В день посева семена инокулировали комплексным микробным препаратом Эковитал [12], в состав которого входили клубеньковые бактерии *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 и УКМ В-6018, а также фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus megaterium* УКМ В-5724. Бактериальная нагрузка составляла 10^7 клеток/семя. В контрольном варианте семена обрабатывали стерильной водопроводной водой. Исследования проводили на базе ННЦ «Институт земледелия НААН» в 2014 году в условиях микрополевых опытов. Площадь учетной делянки – 12,6 м², повторность опыта 4-кратная. Образцы ризосферной почвы отбирали в фазу цветения сои.

Для выявления филумов прокариот в ризосферной почве выделяли тотальную микробную ДНК с применением коммерческого набора Power Soil



DNA Isolation Kit (MO BIO, США). Для конструирования и секвенирования ампликонных библиотек, очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с универсальными праймерами F515 GTGCCAGCMGCC-GCGGTAА и R806 GGACTACVSGGGTATCTAAT на переменный участок V4 гена 16S рРНК с добавлением мультиплексных идентификаторов для каждой пробы и служебных последовательностей, которые были необходимы для протокола Roche [13].

Подготовку проб, создание ампликонных библиотек 16S рРНК и высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе GS Junior (Roche, USA) в соответствии с методическими рекомендациями производителя [13, 14].

Таксономический анализ нуклеотидных последовательностей ампликонных библиотек осуществляли с помощью компьютерного программного модуля QIIME (версия 1.7.0.) [15]. В процессе анализа выполнялись следующие действия: разделение библиотек по идентификаторам, проверка качества секвенирования и фильтрация нуклеотидных последовательностей, объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с использованием 97% порога сходства, выравнивание нуклеотидных последовательностей методом Unclust. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с использованием банка данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). К доминантным относили таксоны, доля которых в микробиоме была 2% и выше. Филумы с низкой представленностью метагеномной ДНК (ниже порога чувствительности прибора) обозначали «0». На основе результатов анализа представленности ОТЕ в пробах рассчитывали индексы биоразнообразия: Шеннона (доля определенного вида в сообществе), Менхиника (индекс видового богатства), а также Бергера-Паркера и Симпсона (индексы доминирования).

Молекулярно-биологические исследования были проведены в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов описательной статистики и компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты

Методом пиросеквенирования в микробиоме ризосферной почвы сои было определено 387 ОТЕ, последовательности которых были идентичны 20 филумам бактерий, одному филуму архей, а также часть ОТЕ не была классифицирована (5,8–26,4%).

Анализ таксономической структуры микробиома темно-серой подзолистой почвы ризосферы сои показал, что абсолютными доминантами были бактерии (92,6% от общего количества идентифицированных последовательностей), археи и неидентифицированные последовательности составляли по 3,7%.



В исследуемой почве обнаружены представители 20 бактериальных филумов и один филум архей (табл. 1). Полученные нами результаты близки к данным Сугияма и соавт. [16]. В ризосферной почве сои, богатой органикой, они определили 17 бактериальных филумов, 13 из которых были выявлены и в наших исследованиях: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *OD1* и *TM7*. Кроме отмеченных, нами идентифицированы еще 7 филумов: *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Elusimicrobia*, *TM6*, *WPS-2*, *AD3* и *Thermi*. Ли и соавт. [17] исследовали солонцевато-щелочную почву ризосферы сои. В этих опытах было обнаружено 11 филумов прокариот: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Armatimonadetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* и *TM7*. На основе имеющихся в литературе и собственных результатов можно предположить, что представители филумов *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* и *TM7* являются характерными для микробиома ризосферы сои, независимо от типа почвы.

Доминирующими филумами во всех вариантах были: *Proteobacteria* – 26,2–7,6%, *Actinobacteria* – 21,4–27,4%, *Acidobacteria* – 11,0–13,3%, *Bacteroidetes* – 1,5–5,4% и *Firmicutes* – 2,1–4,7%. В работе Ли и соавт. [17] доминирующими филумами в ризосфере сои были *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, и *Gemmatimonadetes*, а в исследованиях Сугияма и соавт. [16] – *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в разных вариантах опыта выявлены как количественные различия в представленности отдельных филумов, так и качественные различия в составе микробиома. Показано возрастание представленности филума *Proteobacteria* – с 26,2% в контрольном варианте до 37,6% в варианте с инокуляцией и до 35,8–36,8% в ризосфере сои, семена которой были обработаны фунгицидами совместно с Эковиталом. Также наблюдали увеличение представленности филума *Firmicutes* – с 2,1% в контрольном варианте до 2,6% в варианте с инокуляцией и до 4,6–4,7% в вариантах с фунгицидами и бактериализацией, филума *Bacteroidetes* – с 1,5% до 3,5% и 3,9–5,4% соответственно.

Из результатов видно, что представленность филума *Acidobacteria* повышалась с 11% в контрольном варианте до 12,8% и 13,3% в вариантах с инокуляцией семян Эковиталом и совместно с Кинто дуо, соответственно, но при этом наблюдали тенденцию к уменьшению представленности в варианте с применением инокуляции и фунгицида Максим Стар. Филум *Actinobacteria* был наиболее широко представлен в контрольном варианте и в варианте с инокуляцией и обработкой фунгицидом Максим Стар – по 27,4%, в то же время в вариантах с Эковиталом и совместно с препаратом Кинто дуо представленность снижалась до 25,8% и 21,4%, соответственно.



Таблица 1

Представленность идентифицированных филумов (%)
микробиома темно-серой оподзоленной почвы в ризосфере сои
при применении комплексной инокуляции и фунгицидов

Table 1

Representation of identified phylums (%) in microbiome of dark-grey
podzolic soil in the soybean rhizosphere under application of complex inoculation
and fungicides

Домен	Филум	Контроль	Эковитал	Кинто дуо+Эковитал	Максим Стар+ Эковитал
Archaea	Crenarchaeota	0,8	0,5	0,7	0,6
Bacteria	AD3	0	0	0,05	0,1
	Acidobacteria	11,0	12,8	13,3	10,4
	Actinobacteria	27,4	25,8	21,4	27,4
	Armatimonadetes	0,2	0,1	0,1	0
	Bacteroidetes	1,5	3,5	3,9	5,4
	Chlamydiae	0,2	0,2	0,3	0,2
	Chloroflexi	1	1,1	1,1	1,4
	Cyanobacteria	0,7	0,9	1,2	1
	Elusimicrobia	0,1	0	0,1	0,2
	Firmicutes	2,1	2,6	4,7	4,6
	Gemmatimonadetes	0,9	1,8	1,7	1,7
	Nitrospirae	0,1	0	0,1	0,1
	OD1	0,1	0,1	0	0
	Planctomycetes	0,5	0,8	1,0	0,7
	Proteobacteria	26,2	37,6	36,8	35,8
	TM6	0	0,1	0,1	0,1
	TM7	0,1	0	0	0,1
	Verrucomicrobia	0,4	0,5	1,1	1,3
	WPS-2	0,1	0,5	0,8	0,3
	Thermi	0,1	0,1	0	0
Неклассифицированные		26,4	11,4	11,9	5,8



В вариантах с бактериализацией семян и использованием фунгицидов с последующей инокуляцией наблюдали тенденцию к увеличению представленности филумов *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и *WPS-2*.

Что касается различий в составе микробиома в разных вариантах опыта, то филум *AD3* обнаружили только в вариантах с обработкой семян фунгицидами и инокулянтном. Филум *Armatimonadetes* не выявлен в ризосфере сои, семена которой были обработаны фунгицидом Максим Стар и Эковиталом, а филумы *Nitrospirae* и *Elusimicrobia* – в варианте с бактериализацией. Филумы *OD1* и *Thermi* были обнаружены только в контрольном и в варианте с Эковиталом, а филум *TM7* – в контрольном и в варианте с инокуляцией и Кинто дуо.

При исследовании микробиома ризосферы сои на уровне классов было идентифицировано 28 бактериальных таксонов, из которых доминирующими были 10 классов: *Acidobacteria*, *DA052*, *Solibacteres*, *Actinobacteria*, *Thermoleophilia*, *Saprospirae*, *Bacilli*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria* (рис. 1). Наиболее широко представленными были классы *Actinobacteria* (18,2–28,1%), *Alphaproteobacteria* (10,6–18,2%) и *Betaproteobacteria* (11,0–15,5%).

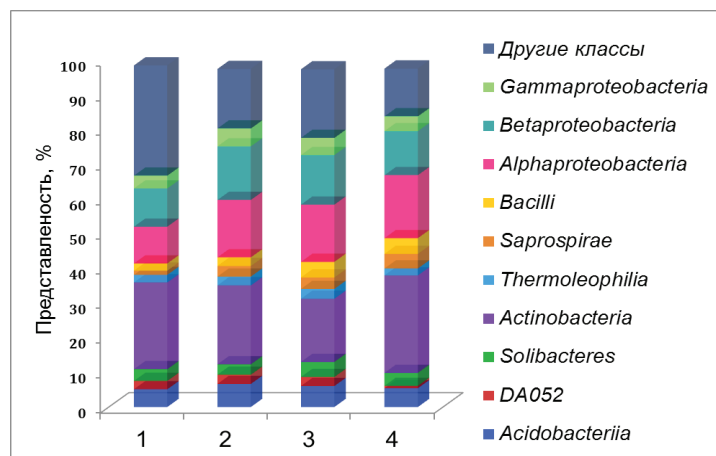


Рис.1. Представленность прокариот на уровне классов, доминирующих в ризосфере сои при применении комплексной инокуляции и фунгицидов.

1 – контроль; 2 – Эковитал; 3 – Кинто дуо+Эковитал; 4 – Максим Стар+ Эковитал
Fig. 1. Representation of prokaryotes at the class level which are dominant in the soybean rhizosphere under application of complex inoculation and fungicides.

1 – Control; 2 – Ecovital; 3 – Kinto duo+Ecovital; 4 – Maxim Star+Ecovital.

Внутри каждого класса также выделяли доминантные порядки. Среди бактерий класса *Alphaproteobacteria* доминантными были порядки *Sphingomonadales* и *Rhizobiales* (табл. 2). Их доля в микробиоме возрастала во всех опытных вариантах в 1,6–2,2 раза по сравнению с контрольным. При этом оба порядка были более широко представлены в варианте с инокуляцией Эковиталом на фоне фунгицида Максим Стар.



Таблица 2

Представленность доминантных порядков (%) ризосферного микробиома сои при применении комплексной инокуляции и фунгицидов

Table 2

Representation of the dominant orders (%) of the soybean rhizosphere microbiome under application of complex inoculation and fungicides

Класс	Порядок	Контроль	Эковитал	Кинто дуо+ Эковитал	Максим Стар+ Эковитал
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	2,8	5,2	4,9	5,7
	<i>Sphingomonadales</i>	4,5	7,1	8,1	10,0
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	10,1	13,1	12,3	9,9
<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	2,9	4,1	4,1	3,2
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	2,1	2,5	4,5	4,5
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i>	5,1	6,7	6,1	5,4
	<i>Ellin6513</i>	2,4	2,7	2,6	0,7
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	25,0	22,8	18,2	28,1
<i>Solibacteres</i>	<i>Solibacterales</i>	3,4	3,0	4,4	3,8
<i>Saprospirae</i>	<i>Saprospirales</i>	1,2	3,1	3,3	4,2
<i>Thermoleophilia</i>	<i>Gaiellales</i>	1,5	1,9	2,2	1,4
Неклассифицированные		26,4	11,4	11,9	5,8

В классе *Betaproteobacteria* преобладал порядок *Burkholderiales* (табл. 2), доля которого в микробиоме увеличивалась в 1,3 и 1,2 раза в вариантах с обработкой семян Эковиталом, а также совместно с фунгицидом Кинто дуо, соответственно. В варианте с совместным использованием Максим Стар и биопрепарата его доля незначительно отличалась от контрольного показателя. Представители порядка *Burkholderiales*, особенно рода *Burkholderia*, защищают большинство культурных растений от болезней, что играет важную роль в борьбе с фитопатогенами [18].

Идентифицированные последовательности бактерий класса *Saprospirae* были отнесены к доминантному порядку *Saprospirales*, относительное содержание которого возрастало в 2,6–3,5 раза во всех опытных вариантах в сравнении с контрольным показателем. Среди класса *Thermoleophilia* определены представители доминантного порядка *Gaiellales*, доля которого была выше в 1,3 и 1,6 раза в ризосфере сои, семена которой инокулировали Эковиталом, и в варианте с Кинто дуо и биопрепаратом (относительно контрольного варианта) соответственно.



Для доминантных классов *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Solibacterales* установлены незначительные изменения их представленности в микробных сообществах, населяющих ризосферную почву сои. Доля идентифицированных бактерий, относящихся к доминантному порядку *Xanthomonadales*, увеличивалась с 2,9% в контрольном варианте до 3,2–4,1% во всех опытных вариантах. Представленность доминантного порядка *Bacillales* возрастала с 2,1% в контрольном варианте до 2,5–4,5% в опытных. Доля представителей порядка *Acidobacteriales* увеличивалась с 5,1% в контрольном варианте до 5,4–6,7% в вариантах с обработкой семян Эковиталом и фунгицидами с последующей инокуляцией, а порядка *Ellin 6513* – с 2,4% до 2,6% и 2,7% (кроме варианта с Максим Стар и биопрепаратом, где этот показатель снижался до 0,7%). Самое высокое относительное содержание обоих порядков было в ризосфере сои, семена которой инокулировали Эковиталом, – 6,7% и 2,7% соответственно. Доля бактерий, отнесенных к порядку *Actinomycetales*, в микробиоме ризосферы сои увеличивалась с 25,0% в варианте без обработки до 28,1% в варианте с Максим Стар и Эковиталом. В остальных опытных вариантах этот показатель снижался до 18,2 и 22,8%. Представленность доминантного порядка *Solibacterales* увеличивалась с 3,4% в контрольном варианте до 3,8 и 4,4% в вариантах с использованием фунгицидов Максим Стар и Кинто дуо с последующей бактериализацией, соответственно.

Следует подчеркнуть, что в результате исследований идентифицированы также представители домена архей, которые были отнесены к филуму *Crenarchaeota*, классу *Thaumarchaeota* и 2 порядкам *Cenarchaeales* и *Nitrososphaerales*, доля которых была самой высокой в контрольном варианте.

На повышение биоразнообразия в вариантах с применением Эковитала и фунгицидов указывают основные индексы биоразнообразия (табл. 3). Увеличение индекса Шеннона с 3,4 в контрольном варианте до 3,82–3,97 в вариантах с применением комплексного микробного препарата Эковитал и фунгицидов совместно с инокуляцией свидетельствует о возрастании биоразнообразия. Значение индекса видового богатства Менхиника также увеличивалось с 136 в контрольном варианте до 140–155 в варианте с комплексной обработкой семян. Это может свидетельствовать о благоприятных условиях для формирования широкого полиморфизма прокариот темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои. Снижение индексов доминирования Симпсона и Бергера-Паркера в вариантах с применением Эковитала и фунгицидов также указывает на увеличение биоразнообразия ризосферных бактерий в этих вариантах.

Таким образом, при исследовании микробиома ризосферы сои методом пиросеквенирования идентифицированы 20 филумов, 28 классов и 44 порядка бактерий, а также один филум, один класс и два порядка архей. Доминирующими филумами во всех вариантах были *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*. Комплексная инокуляция и комбинированная обработка семян сои биопрепаратом Эковитал с фунгицидами способствовала возрастанию представленности доминантных филумов прокариот по сравнению с контрольным вариантом.



Экологические показатели биоразнообразия прокариот почвенного ризосферного микробиома

Table 3

Ecological indicators of prokaryotes biodiversity of soil rhizosphere microbiome

Индексы	Контроль	Эковитал	Кинто дуо+ Эковитал	Максим Стар+ Эковитал
Индекс видового богатства (индекс Менхиника)	136	140	155	153
Индекс Шеннона	3,4	3,82	3,93	3,97
Индекс доминирования Симпсона	0,1	0,05	0,045	0,044
Индекс доминирования Бергера-Паркера	0,26	0,12	0,16	0,15

Увеличение индексов Шеннона и Менхиника и снижение индексов доминантности Симпсона и Бергера-Паркера указывают на возрастание биоразнообразия прокариот в ризосфере сои, инокулированной комплексным биопрепаратом, а также при комбинированной обработке семян фунгицидами с последующей бактеризацией Эковиталом.

Г.О. Іутинська¹, Л.В. Титова¹, О.Г. Пінаєв², Є.Є. Андронов²,
С.В. Вознюк¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143, тел.: +38(044) 526 34 79, e-mail: vozsvet@gmail.com

²Федеральна державна бюджетна наукова установа «Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології», шосе Підбільського, 3, м.Санкт-Петербург, 196608, Росія, тел.: +7 (812) 470 51 00, e-mail: eeandr@gmail.com

БІОРІЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРОБІОМУ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ЗАСТОСУВАННЯ ФУНГІЦИДІВ ТА ІНОКУЛЯЦІЇ МІКРОБНИМ ПРЕПАРАТОМ ЕКОВІТАЛ

Реферат

Біорізноманітність ґрунтових мікроорганізмів в агроєкосистемах відіграє ключову роль у стабілізації та збереженні родючості ґрунтів, підвищенні продуктивності рослин. **Мета.** Вивчити різноманітність філумів мікробіому темно-сірого підзолістого ґрунту у ризосфері сої, насіння якої оброблене фунгіцидами з подальшою інокуляцією комплексним мікробним препаратом Ековітал. **Методи.** Молекулярно-біологічні, піросеквенування ПЦР-ампліфікатів ділянки V4 гена 16S рРНК. **Результати.** У мікробіомі ризосфери сої ідентифіковано 20 філумів, 28 класів і 44 порядки бактерій, а також один філум, один клас і два порядки архей. Представленість філуму Proteobacteria



зростала з 26,2% у контрольному варіанті до 35,8–37,6% у варіантах з обробкою фунгіцидами та інокуляцією, а філумів *Bacteroidetes*, *Firmicutes* і *Acidobacteria* – з 1,5%, 2,1% та 11% у контрольному варіанті до 3,5–5,4%, 2,6–4,7% і 12,8–13,3%, відповідно, в усіх варіантах обробки. Збільшення індексів біорізноманітності (Шеннона і Менхініка) та зниження індексів переважання (Сімпсона і Бергера-Паркера) вказують на зростання біорізноманітності у варіантах із застосуванням комплексного інокулянта Ековітал, а також фунгіцидів з Ековіталом. **Висновки.** Комплексна інокуляція і її застосування з фунгіцидами сприяли збільшенню біорізноманітності прокаріот у ризосфері сої.

Ключові слова: мікробіом, біорізноманітність, ризосфера сої, піросеквенування, інокуляція, фунгіциди.

G.O. Iutynska¹, L.V. Tytova¹, O.G. Pinaev², E.E. Andronow²,
S.V. Vozniuk¹

¹D.K.Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine
tel.: +38(044) 526 34 79, e-mail: vozsvet@gmail.com

²All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific
Organizations, 3, Podbelskogo str,
St. Petersburg, 196608, Russia,
tel.: +7 (812) 470-51-00, e-mail: eeandr@gmail.com

MICROBIOME BIODIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER APPLICATION OF FUNGICIDES AND INOCULATION BY MICROBIAL BIOFORMULATION ECOVITAL

Summary

Biodiversity of soil microorganisms in the agroecosystems plays the major role for stabilization and conservation of soil fertility, increasing plants productivity. Aim. To study the diversity of microbiome phylums of the dark-grey podzolic soil in the soybean rhizosphere, the seeds treated by fungicides with following inoculation with the complex microbial bioformulation Ecovital. **Methods.** Molecular-biological methods, pyrosequencing of PCR-amplicons of 16S rRNA gene V-4 region. **Results.** In soybean rhizosphere microbiome, there were identified 20 phylums, 28 classes and 44 orders of Bacteria, and one phylum, one class and two orders of Archaea. The representation of Proteobacteria phylum has increased from 26.2% in the control sample to 35.8–37.6% in the samples with the application of fungicides and inoculation, Bacteroidetes, Firmicutes and Acidobacteria phylums has increased from 1.5%, 2.1% and 11% in the control sample to 3.5–5.4%, 2.6–4.7% and 12.8–13.3% in all researched samples, respectively. The increase of biodiversity indices (Shannon's and Menhinik's indices) and the decrease of dominance indices (Simpson's and Berger-Parker's indices) indicate the increase of biodiversity for the samples with application of complex inoculant Ecovital and fungicides with Ecovital. **Conclusions.** Complex inoculation and its combined use with fungicides have promoted the increase of prokaryotes biodiversity in soybean rhizosphere.

Key words. microbiome, biodiversity, pyrosequencing, inoculation, fungicides.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schloss P.D., Handelsman J.* Toward a census of bacteria in soil // PLOS Computational Biology. – 2006. – № 2. – P. 786–793.
2. *Usman S., Muhammad Y., Chiroman A.M.* Roles of soil biota and biodiversity in soil environment – a concise communication // Eurasian J Soil Sci. – 2016. – 5, №4. – P. 255–265.
3. *Gougoulias C., Clark J.M., Shaw L.J.* The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems // J Sci Food Agric. – 2014. – №94. – P. 2362–2371.
4. *Boyle S.A., Yarwood R.R., Bottomley P.J., Myrold D.D.* Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon // Soil Biology and Biochemistry. – 2008. – № 40. – P. 443–451.
5. *Aislabie J., Deslippe J.R.* Soil microbes and their contribution to soil services // Dymond J.R. Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand. – 2013. – P. 143–162.
6. *Hartmann A., Rothballer M., Schmid M., Hiltner L.* A pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research // Plant and Soil. – 2007. – 312, №1–2. – P. 7–14.
7. *Handelsman J.* Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2004. – 68, № 4. – P. 669–685.
8. *Rincon-Florez V.A., Carvalhais L.C., Schenk P.M.* Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology // Diversity. – 2013. – № 5. – P. 581–612.
9. *Fakruddin M.D., Chowdhury A., Nur Hossain M.D., Bin Mannan K.S., Mazumdar R.M.* Pyrosequencing – principles and applications // International Journal of Life Science and Pharma Research. – 2012. – 2, № 2. – P. 65–76.
10. *Hussain S., Siddique T., Saleem M., Arshad M., Khalid A.* Impact of Pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions // Advances in Agronomy. – 2009. – 102, № 1. – P. 159–200.
11. *Loa C-C.* Effect of pesticides on soil microbial community // Journal of Environmental Science and Health (Part B). – 2010. – №45. – P. 348–359.
12. *Patent UA 101388 C2 (Ukraine), IPS (2013.01) C 05 F 11/100, C 12 P 39/00.* Complex microbial bioformulation Ecovital for leguminous crops seeds inoculation. Tytova LV, Leonova NO, Brovko IS, Iutyńska GA. Pub. 25.03.2013, Bull. N 6.
13. *Sequencing Method Manual for GS Junior Titanium Series.* Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. – 2012. – 26 p.
14. *emPCR Amplification Method Manual. Lib-L for GS Junior Titanium Series.* Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. – 2012. – 12 p.
15. *Kuczynski J., Stombaugh J., Walters W.A., Gonzalez A., Caporaso J.G., Knight R.* Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. Curr Protoc. In Bioinformatics. – 2012. – 28 p.



16. Sugiyama A., Ueda Y., Zushi T., Takase H., Yazaki K. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field // PLOS ONE. – 2014. – 9, №6. – P. 1–9. (www.plosone.org).

17. Li X., Sun M., Zhang H., Xu N., Sun G. Use of mulberry-soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community // Microbial Biotechnology. – 2016. – 9, № 3. – P. 293–304.

18. Van Der Heijden M.G., Bardgett R.D., Van Straalen N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems // Ecol Lett. – 2008. – № 11. – P. 296–310.

References

19. Schloss PD, Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil. PLOS Computational Biology. 2006; (2): 786-793.

20. Usman S, Muhammad Y, Chiroman AM. Roles of soil biota and biodiversity in soil environment – a concise communication. Eurasian J Soil Sci. 2016; 5 (4): 255- 265.

21. Gougoulas C, Clark JM, Shaw LJ. The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. J Sci Food Agric. 2014; (94): 2362-2371.

22. Boyle SA, Yarwood RR, Bottomley PJ, Myrold DD. Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon. Soil Biology and Biochemistry. 2008; (40): 443-451.

23. Aislabie J, Deslippe JR. Soil microbes and their contribution to soil services. Dymond JR ed. Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand. 2013: 143-162.

24. Hartmann A, Rothballer M, Schmid M, Hiltner L. A pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant and Soil. 2007; 312(1-2): 7-14.

25. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2004; 68(4): 669-685.

26. Rincon-Florez VA, Carvalhais LC, Schenk PM. Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. Diversity. 2013; (5): 581-612.

27. Fakruddin MD, Chowdhury A, Nur Hossain MD, Bin Mannan KS, Mazumdar RM. Pyrosequencing – principles and applications. International Journal of Life Science and Pharma Research. 2012; 2 (2): 65-76.

28. Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. Impact of Pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. Advances in Agronomy. 2009; 102(1):159-200.

29. Loa C-C. Effect of pesticides on soil microbial community. Journal of Environmental Science and Health (Part B). 2010; (45): 348-359.



30. Patent UA 101388 C2 (Ukraine), IPS (2013.01) C 05 F 11/100, C 12 P 39/00. Complex microbial bioformulation Ecovital for leguminous crops seeds inoculation. Tytova LV, Leonova NO, Brovko IS, Iutynska GA. Pub. 25.03.2013, Bull. N 6.
31. Sequencing Method Manual for GS Junior Titanium Series. Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. 2012. 26 p.
32. emPCR Amplification Method Manual. Lib-L for GS Junior Titanium Series. Method Manual. 454 Life Sciences Corp. A Roche Company Branford. 2012. 12 p.
33. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, Gonzalez A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. Curr Protoc. In Bioinformatics. 2012. 28 p.
34. Sugiyama A, Ueda Y, Zushi T, Takase H, Yazaki K. Changes in the bacterial community of soybean rhizospheres during growth in the field. PLOS ONE. 2014; 9(6): 1-9. (www.plosone.org).
35. Li X, Sun M, Zhang H, Xu N, Sun G. Use of mulberry–soybean intercropping in salt-alkali soil impacts the diversity of the soil bacterial community. Microbial Biotechnology. 2016; 9(3): 293-304.
36. Van Der Heijden MG, Bardgett RD, Van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecol Lett. 2008; (11): 296-310.

Стаття надійшла до редакції 23.01.2017 р.

