

ОЦІНКА МЕТАГЕНОМУ ПРОКАРІОТНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМУ ЗА АГРАРНОГО ВИКОРИСТАННЯ

*М.В. Патица, О.Л. Тонха, Т.І. Патица,
М.О. Кіроянц, С.В. Веретюк*

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 13, Київ, 03041, Україна
e-mail: midiya1993@gmail.com*

Мета. Комплексні дослідження метагеномних ресурсів і структури прокаріотного різноманіття, яке формується в ґрунтах за різного аграрного використання (чорнозем звичайний). **Методи.** Молекулярно-біологічні – екстракція тотальної ДНК, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації 16s рРНК, візуальна детекція зразків ДНК, аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, польові – системи землеробства. **Результати.** Встановлено, що при ґрунтозахисних системах (в т.ч. без добрив) видове багатство прокаріот чорнозему звичайного у 2–3,8 рази менше порівняно з оранкою, що обумовлює перманентне зниження ґрунтової родючості. Виявлено різноманітну та трофічно складнішу будову філотипової структури ґрунтового бактеріального мікробіоценозу за різноглибинного безпліцевого обробітку (шар 0–5 см). Його основу складають сім основних кластерів домінуючих генотипів, що відносяться до представників 98 видів, 31% яких некультивовані. За оранки якісний склад ґрунтового мікробіоценозу характеризувався сімома кластерами і видовим багатством з 57 видів, з яких 40% некультивовані. Застосування оранки зумовлює диференціацію за кількісним складом – у верхньому (0–5 см) шарі в 1,7 рази більше видове багатство бактеріального комплексу, ніж у нижньому (5–20 см). Якісний склад домінуючих генотипів прокаріот багатший на 73% при застосуванні оранки у порівнянні з варіантом мілкового плоскорізного обробітку. **Висновки.** Системи землеробства, в першу чергу за рахунок обробітку ґрунту, у значній мірі впливають на філотипове різноманіття ґрунтових мікроорганізмів з найскладнішою його будовою за різноглибинного безпліцевого обробітку. Оранка зумовила диференціацію за кількістю домінуючих генотипів у різних шарах ґрунту.

Ключові слова: прокаріотний комплекс, tRFLP аналіз, чорнозем, мікробне різноманіття.

Мікробний біом та метагеном біоценозу ґрунту зумовлює основну функціональну роль у кругообігу речовин та енергії і є ключовими складовими елементами трансформації органічних решток, таких як мінералізація та іммобілізація біогенних елементів. Процеси синтезу і накопичення органічної речовини в агроценозах в першу чергу залежать від структури, різноманіття та активності мікробіоти, при цьому вона має прямий взаємозв'язок з умовами самого ґрунтового середовища. Тому дослідження біому ґрунтових мікроорганізмів є науковою основою для розробки заходів, що спрямовані на розширене відтворення родючості чорноземів.

Застосування молекулярно-біологічних методів розширило можливість комплексних досліджень, дало змогу встановити, що мікробним системам належить первинна роль у формуванні біому та метагеному, і, відповідно, продуктивності ґрунту. Але активне землекористування призводить до суттєвого порушення біологічних систем ґрунту. Один із шляхів вирішення цієї проблеми – детальне та комплексне дослідження біологічних ресурсів і структури мікробного різноманіття, яке формується за аграрного використання ґрунтових ресурсів. В процесі всієї історії землекористування суттєво змінювалась структура мікробного біому на рівні домінуючих (корових) трофічно значущих видових комплексів [1, 2]. Тому внаслідок цих змін відбувалось збіднення спектру біогенних елементів і виснаження ґрунтових ресурсів. Таким чином, застосування агротехнічних заходів обумовлює структурно-функціональні зміни метагеному прокаріот та спрямованість, в першу чергу, трофічних вуглецевих мікробних потоків у ґрунті. Поверхневий обробіток чорнозему типового, на відміну від диференційованого, сприяє функціональній активності мікробіоти в рослинно-мікробній системі ризосфери, в якій метаболічно перетворюються фотосинтезовані вуглецьвмісні сполуки корневих ексудатів, і саме з ними пов'язані процеси ґрунтоутворення та баланс біогенних елементів у ґрунті [3, 4]. Підвищена кількість вуглецьвмісних органічних речовин як добрив обумовлює високий рівень мікробного біорізноманіття, а також активізацію складних мікробних процесів трансформації вуглецьвмісних сполук, що сприяє покращенню екологічного стану та створює умови для гомеостатичного формування агроecosистем в цілому. Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях природних агроценозів, а саме кількісна оцінка прокаріотного комплексу, дасть змогу скласти карту біологічного фонду чорноземів України цілинних та освоєних земель, що є частиною постійного мікробіологічного моніторингу. Оцінка біомаси прокаріотів дозволить науково обґрунтувати застосування систем обробітку і удобрення ґрунту і дасть змогу управляти ґрунтовими процесами. Дослідження генетичної різноманітності прокаріотних генотипів дозволить створити банк даних генетичних ресурсів біоти чорноземів, що дасть змогу науково обґрунтовано використовувати саме ті агрозаходи, які найменше порушуватимуть гомеостаз ґрунтів, безпомилково здійснювати їх економічно і екологічно оцінку та ін.

Мета даної роботи – дослідити молекулярно-біологічними методами структуру мікробного комплексу та біорізноманіття чорнозему типового, зміни домінуючих угруповань мікробіому під впливом різних систем землеробства і обробітку, оцінити біомасу за кількістю тотальної ДНК ґрунтових організмів.

Матеріали і методи. Вирішення теоретичних і практичних питань з вивчення біологічної активності та молекулярно-біологічного поліморфізму прокаріот. Дослідження показників гумусного стану в умовах агроценозу та розробку заходів щодо забезпечення розширеного відтворення родючості чорноземів проведено на базі ВП НУБіП України «Великоснітинське НДГ ім. О.В. Музиченка» Фастівського району Київської області (чорнозем типовий малогумусний пилувато-середньосуглинковий).

В геоморфологічному відношенні це Придніпровська височина, що входить до північної частини правобережного Лісостепу. Нижче представлена морфологічна характеристика ґрунтового покриву дослідної ділянки:

Н <u>0 – 62</u> 62	Гумусо-аккумулятивний горизонт, темно-сірий, свіжий, пухкий, середньосуглинковий, зернисто-пилувато-грудкуватої структури, зустрічаються черворіїни та копроліти, карбонати закипають з 40 см, пронизаний корінням рослин, перехід поступовий за кольором та наявністю карбонатів;
Нрк <u>63 – 105</u> 42	верхній перехідний горизонт, темно-сірий, слабо ущільнений, середньосуглинковий, зернисто-грудкуватий, карбонати у вигляді кристалів з'являються з середини горизонту по ходам черворіїн, перехід поступовий за кольором;
Phk <u>106 – 175</u> 69	нижній перехідний горизонт, брудно-палевий, нерівномірно гумусований, злегка ущільнений, легкогрудкуватої структури, переритий кротовинами і черворіїнами, містить копроліти, тонкі корені трав'янистих рослин, карбонати у вигляді кристалів, перехід до породи поступовий за кольором;
Рк 176 і нижче	ґрунтоутворююча порода, жовтувато-палевий карбонатний, крупнопилувато-середньосуглинковий лес.

Верхній генетичний горизонт досліджуваного ґрунту складений на 51,2–65,4% крупним пилом, 16,8–16,7% – мулом та містить 30,8–32,2% глини. Таке співвідношення глини та крупного пилу в даному ґрунті не сприяє утворенню водостійких макроагрегатів, що може спричинити агрофізичну деградацію за інтенсивного технологічного навантаження на ґрунт. Фізико-хімічні та агрохімічні показники чорнозему типового дослідної ділянки наведено в таблиці 1.

Загалом ґрунт характеризується сприятливими фізико-хімічними та агрохімічними показниками для росту сільськогосподарських культур. Гумусовий горизонт має близьку до нейтральної реакцію ґрунтового середовища, середню забезпеченість азотом легкогідролізованих сполук (метод Тюріна і Конової) та рухомими формами фосфору і обмінним калієм (метод Чирікова) у шарі 0–30 см і 30–50 см.

Таблиця 1

Фізико-хімічні та агрохімічні показники чорнозему типового середньосуглинкового на лесі

Показники	Верхній гумусовий горизонт, см	
	0–30	30–50
pH водної витяжки	6,7 ± 0,15	6,9 ± 0,15
pH сольової витяжки	6,3 ± 0,15	6,7 ± 0,15
Гідролітична кислотність, мгекв /100 г ґрунту	0,91 ± 0,09	0,52 ± 0,05
Сума увібраних основ, мекв /100 г ґрунту	28,0 ± 2,8	24,5 ± 2,4
Гумус, %	3,57 ± 0,06	3,46 ± 0,08
Азот легкогідролізованих сполук за Тюріним і Коновою, мг /кг ґрунту	49,6 ± 10,41	44,2 ± 9,28
P ₂ O ₅ за Чиріковим, мг /кг ґрунту	59,8 ± 8,97	51,3 ± 7,70
K ₂ O за Чиріковим, мг /кг ґрунту	58,2 ± 8,73	48,8 ± 7,32

З 2010 року дослідження проводяться у коротко-ротаційній сівозміні: соя→пшениця озима→кукурудза на зерно→ячмінь.

Обробіток ґрунту представлений наступними варіантами:

1. Традиційний, що базується на оранці під різні культури на глибину 22–27 см, варіант «оранка».

2. Ґрунтозахисний, який базується на різноглибинному безполицевому обробітку під різні культури на глибину 22–27 см, варіант «різноглибинний безполицевий обробіток».

3. Ґрунтозахисний, що базується на мілкому плоскорізнному обробітку на 10–12 см, варіант «мілкий безполицевий обробіток».

У системі удобрення використовували місцеві ресурси – солому і вирощування сидератів. Досліджували дію трьох систем удобрення: 1. Контроль (без добрив); 2. Солома 1,2 т/га + N₁₂ + N₇₈P₆₈K₆₈;

3. Солома 1,2 т/га + N₁₂ + сидерати + N₇₈P₆₈K₆₈.

Внесення соломи і висівання сидератів проводили у полі після збирання пшениці озимої. Розміщення варіантів проводили методом розщеплених ділянок. Розмір елементарної ділянки – 6х30=180м², облікової ділянки – 100м². Біологічні дослідження ґрунту проводили у період активної вегетації рослин (травень) у 0–5, 5–20, 20–40 – сантиметрових шарах ґрунту.

Відпрацьовано оригінальну методику екстракції тотальної ДНК мікроорганізмів, за основу якої був взятий метод J.J. Doyle, J.L. Doyle [9]. 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 [11]. В дослідженні використовували маркер молекулярних мас (1500 bp, Geneuler DNA Ladders від ThermoScientific).

Для ампліфікації фрагменту 16S рРНК прокаріот проводили ПЛР реакцію з флуоресцентно-міченими праймерами EU3 (63f* : 5'-AGGCСТААСАТGСАAGTC-3', 1494г: 5'-TACGGYTACСТTG-ТТАСGAC-3'). ПЛР проводили для подальшого визначення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів.

Кількісну оцінку тотальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів проводили за допомогою спектрофотометра Beckman DU 800. Таксономічну структуру прокаріот визначено за методом аналізу поліморфізму довжин термінальних рестрикційних фрагментів (Terminal restriction fragment length polymorphism – tRFLP) [10, 7]. 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 фрагменту в сумарній ДНК (площ під піком). Для видової класифікації фрагментів tRFLP використовували програму TRFLP Fragsort [12]. Крім цього, аналізували нуклеотидні послідовності та перевіряли їх ідентичність з відповідними послідовностями 16S рРНК бази даних GenBank. Аналіз результатів секвенування здійснювали за допомогою програми Vector NTI Advance [13]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за

загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методиками з комп'ютерним опрацюванням отриманих даних за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2017.

Результати. Надмірні норми мінеральних добрив, підсилюючи процеси мінералізації органічних речовин, є передумовою втрат гумусу в ґрунті. Тому важливо сучасними методами оцінити якісний і кількісний склад прокаріотів чорноземних ґрунтів та їх зміни під впливом обробітків і удобрення. Кількість загальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів у чорноземах типових залежала від варіантів удобрення, обробітку ґрунту і глибини шару (рис. 1).

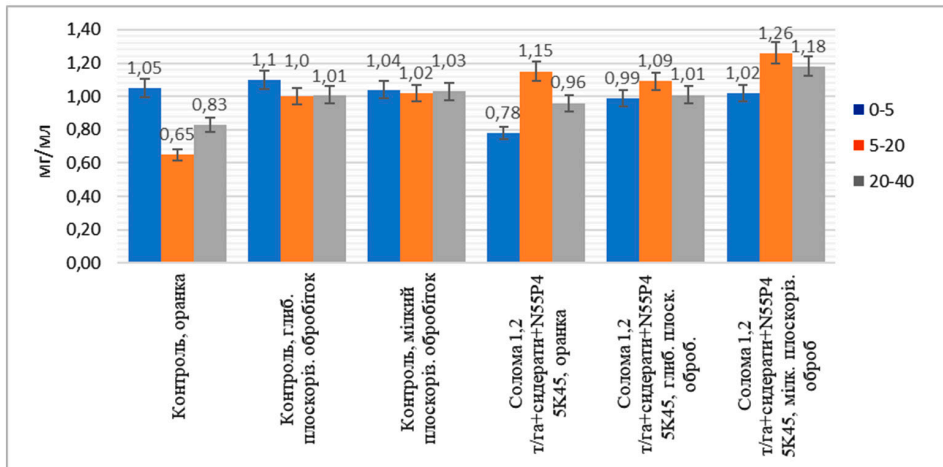
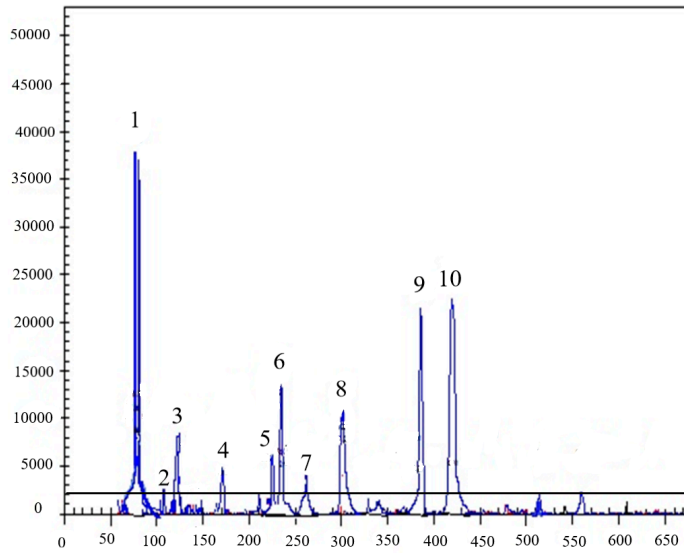


Рис. 1. Кількість загальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів у чорноземі типовому за різних обробітків і удобрення ґрунту, стаціонарний дослід «Великоснітинське НДГ ім. О.В. Музиченка»

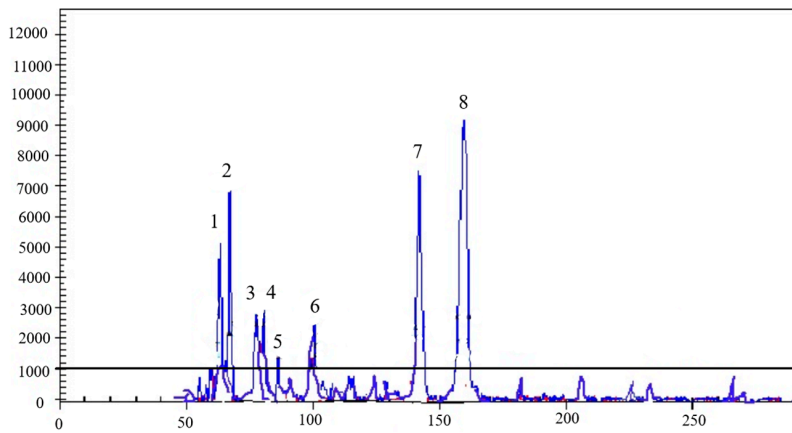
Порівнюючи кількість загальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів у шарі 0–5 см у контрольних варіантах, виявили, що найвище значення спостерігалось за мілкою плоскорізного обробітку, найменше – у дослідному варіанті з соломою 1,2 т/га+сидерати+N₅₅P₄₅K₄₅, оранка. Шар 5–20 см характеризувався найменшим вмістом ДНК у контрольному варіанті за оранки. Більша кількість ДНК ґрунтових мікроорганізмів є передумовою збереження рівноваги екосистеми під впливом зовнішніх факторів.

Орґано-мінеральна система удобрення ґрунту та внесення соломи і сидератів за різних його обробітків приводили до змін кількості ДНК мікроорганізмів порівняно з контролем. Так, найвищі значення фіксувались у шарі 5–20 см за усіх обробітків. Шар 20–40 см характеризувався більшими значеннями за мілкою плоскорізного обробітку з орґано-мінеральним варіантом удобрення, найменшим – за оранки. Тобто, ґрунтозахисні обробітки як на удобреному, так і у варіанті без добрив створювали кращі умови для розвитку мікроорганізмів порівняно з варіантом оранки.

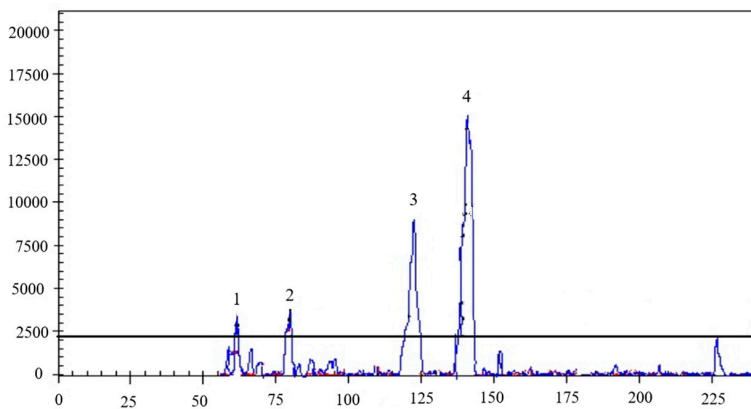
Аналіз профілів tRFLP прокаріотного комплексу та його змін під впливом різних обробітків ґрунту і варіантів удобрення, отриманих із зразків чорноземів типових (рис. 2), надає можливість оцінити біорізноманіття ґрунтового мікробного комплексу.



Мілкий безполицевий обробіток



Різноглибинний безполицевий обробіток



Оранка

Рис. 2. Вплив сільськогосподарського використання на генетичну різноманітність прокаріот у чорноземі типовому за різних способів обробітку ґрунту у варіанті «контроль», шар 0-5 см (профіль tRFLP). На осі абсцис вказаний розмір рестрикційних фрагментів, вр (пар нуклеотидів), на осі ординат – інтенсивність флуоресценції

Так, у варіанті без добрив у шарі 0–5 см при використанні мілкого безполицевого обробітку формується найбільша кількість термінальних фрагментів (10 фрагм.) зі значним ступенем детекції (ступінь домінування), за різноглибинного безполицевого – дещо нижчий, і найнижча кількість фрагментів (4) у варіантах з оранкою (рис. 2). На фонах різного обробітку ґрунту виявилась різна детекція термінальних фрагментів (різноманіття таксономічних одиниць), найбільші показники кількості термінальних фрагментів (видового багатства) були за мілкого безполицевого обробітку, далі за оранки і глибокого плоскорізного обробітку. Слід зазначити, що склад мікроорганізмів за мілкого і різноглибинного безполицевого обробітку був близьким один до одного, що свідчить про схожість за впливом цих агрозаходів на мікробіоту.

В шарі 5–20 см за використання мілкого безполицевого обробітку було визначено найбільшу кількість (7) термінальних фрагментів на відміну від оранки і різноглибинного безполицевого обробітку.

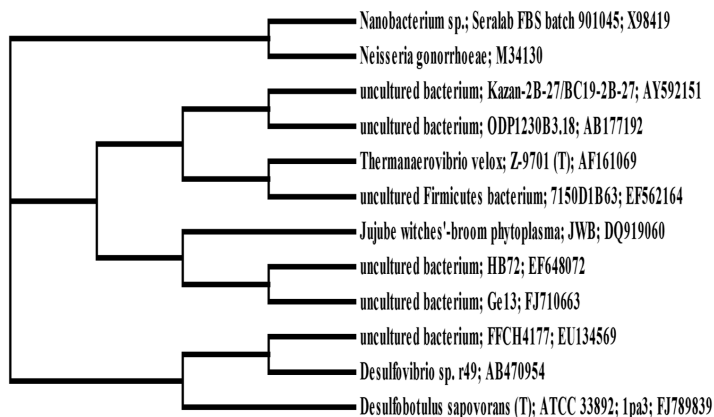
У варіанті удобрення соломою 1,2 т/га + сидерати + $N_{55}P_{45}K_{45}$ в шарі 20–40 см за використання глибокого безполицевого обробітку отримано найбільшу кількість (11) термінальних фрагментів, що майже у два рази більше, ніж за оранки і мілкого плоскорізного обробітку. При цьому визначено, що ступінь домінування є найбільшим за мілкого плоскорізного обробітку, меншим – за оранки та різноглибинного безполицевого обробітку.

Філогенетичний аналіз дендрограм (рис. 3) свідчить про ширшу і складнішу побудову філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів. Тобто, сільськогосподарське використання викликало зменшення біорізноманіття прокаріотного комплексу у 2 рази, особливо в шарі 20 – 40 см. Домінування морфотипів за інтенсивністю флуоресценції в шарі 20–40 см було наступним: найвище – за мілкого безполицевого обробітку, далі – за оранки, різноглибинного безполицевого обробітку. Слід зазначити, що у варіантах з удобренням соломою і сидератами в шарі 20–40 см було отримано у три рази менші показники ступеня домінування окремих морфотипів у порівнянні з контролем. Отже, обробітки ґрунту і система удобрення є потужним інструментом, що впливає на різноманіття прокаріот у чорноземі типовому.

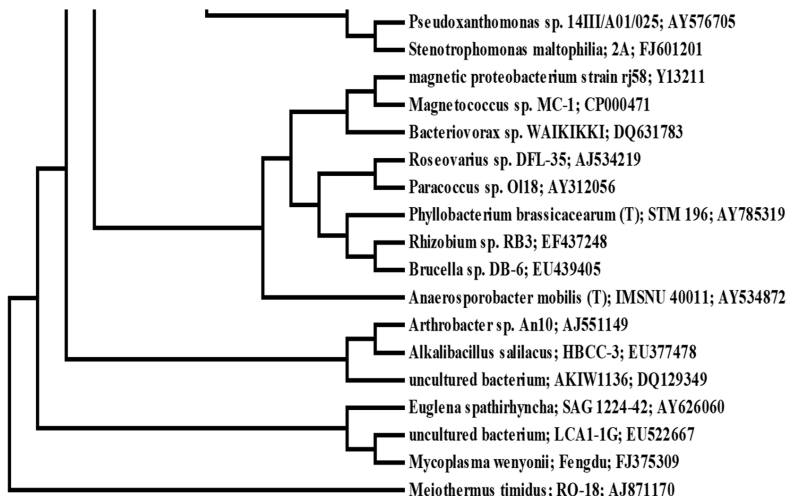
У шарі 0–5 см у варіанті без добрив за використання мілкого безполицевого обробітку і органо-мінеральної системи удобрення з соломою та сидератами за використання глибокого безполицевого обробітку формувався біом за рахунок декількох домінуючих груп мікроорганізмів. У шарі 5–20 см найбільшу кількість термінальних фрагментів отримано за використання оранки і сумісного застосування соломи 1,2т/га + N_{12} + сидератів + $N_{78}P_{68}K_{68}$, а також на фоні мілкого плоскорізного обробітку.

Аналіз прокаріотного комплексу профілів tRFLP, отриманих із зразків чорноземів типових, надає можливість зрозуміти зміни біорізноманіття мікробного комплексу ґрунту у різних варіантах обробітку і удобрення стаціонарного досліду. Застосування мілкого безполицевого обробітку без добрив (варіант «контроль») призводило до формування мікробоценозів в шарі 0–5 см, які склалися з трьох основних кластерів, 7 підкластерів, 12 видів, відповідали шести домінантним генотипам, що належать до представників філотипів *Nanobacterium*, *Beta Proteobacteria*, *Jujubewitches*,

Desulfovibrio і *Desulfobotulus*, значну частину з яких становлять некультивовані види ґрунтових бактерій. Шар 5–20 см характеризувався чотирма кластерами, 9 підкластерами і 18 видами (рис. 3).



1



2

Рис. 3. Генетичний поліморфізм прокаріотів у чорноземі типовому за мілкого плоскорізного обробітку у контролі (1 – в шарі 0-5 см; 2 – в шарі 5-20 см)

Застосування оранки у варіанті без добрив у шарі 0–5 см формувало мікробоценоз, який складався з шести кластерів, 20 підкластерів, 46 видів (рис. 4).

Різноглибинний безполицевий обробіток у варіанті без добрив в шарі 5–20 см формував мікробоценоз, який складався з трьох кластерів, 7 підкластерів, 19 видів родів *Pirellula*, *Bacillus*, *Clostridiales bacterium*, *Eubacterium*, *Nitrospina*, *Halomonas*, *Azospirillum*. У шарі 0–5 см 70% видів не культивуються на поживних середовищах, у шарі 5–20 см – 47%.

У ґрунті контрольного варіанту за застосування оранки формувалась найбільша кількість видів: у 3,8 рази більше порівняно з варіантом

мілкого плоскорізного обробітку і у 2 рази – з варіантом глибокого плоскорізного обробітку. За безполицевого обробітку формувались угруповання мікроорганізмів, у яких переважали некультивовані форми (35–70%).

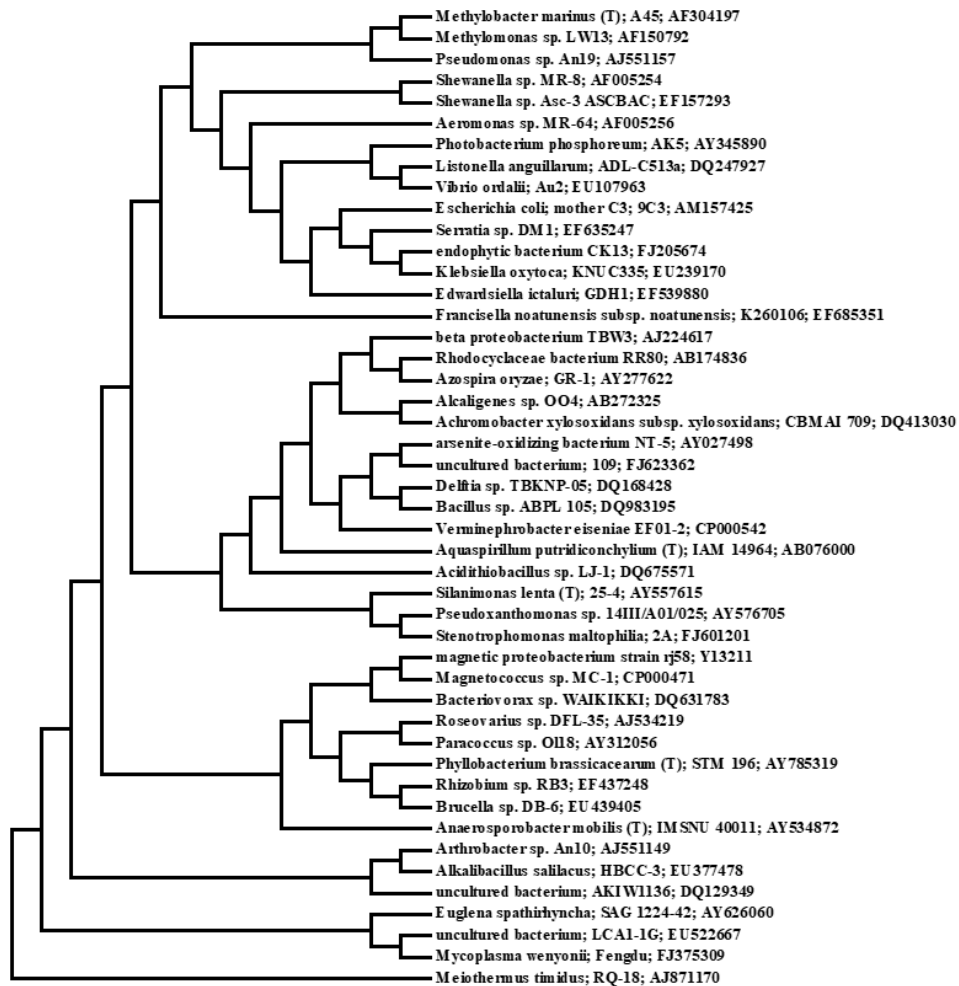


Рис. 4. Генетичний поліморфізм прокаріот у чорноземі типовому за оранки у контрольному варіанті

Аналіз розподілу прокаріотних генотипів ґрунтового мікробного комплексу у шарі 0–20 см за мілкого плоскорізного обробітку свідчить про наявність 8 основних кластерів, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 33 видів, 18% з яких некультивовані. Шар 20–40 см характеризувався 5 основними кластерами, 35 видами, 37% бактерій з яких некультивовані. Отже, кількість прокаріот найбільш поширених родів незначно відрізняється за мілкого плоскорізного обробітку у різних шарах ґрунту.

Мікробний комплекс прокаріот за оранки в цілому характеризувався наявністю 7 основних кластерів, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 57 видів, 40% з яких некультивовані. Так, шар 20–40 см представлений 8 основними кластерами, 33 видами, 21% бактерій з яких некультивовані. Оранка зумовлювала диференціацію

за кількістю видів мікроорганізмів: верхній (0–5 см) шар містив у 1,7 рази більше видів бактерій, ніж нижній (5–20 см). Кількість домінуючих генотипів прокариот більша на 73% за оранки порівняно з варіантом за мілкого плоскорізного обробітку.

Мікробний комплекс за глибокого безполицевого обробітку представлено 7 основними кластерами, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 98 видів, 31% з яких некультивовані. Так, у шарі 5–20 см за різноглибинного безполицевого обробітку виявлено наявність 5 кластерів, які представлені 93 видами, 37% з яких некультивовані.

Отже, в усіх варіантах обробітку ґрунту були присутні представники родів прокариотів, які беруть участь у трансформації органічних сполук, кругообігу азоту, фосфору, калію, сірки, вуглецю та ін.: *Acinetobacter*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Nitrosomonas*, *Nisaea*, *Elioraea*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulfovibrio*. За оранки формувалась велика кількість видів бактерій, які беруть участь у циклі азоту, в 2,5 рази більша порівняно з варіантом мілкого безполицевого обробітку. За умов глибоких обробітків (оранка, різноглибинний безполицевий обробіток) мікробні угруповання характеризувалися наявністю *Pectobacterium* (2 види за оранки, 5 – за глибокого плоскорізного обробітку), *Modicisalibacter*, *Chromohalobacter*, *candidatus Kuenenia*, *Nitrospira*, *Hippea*, *Desulfobacca*. Обробітки без обертання скиби (мілкий і різноглибинний безполицевий) сприяли розвитку *Pseudomonas*, *Thiohalorhabdus*, *Dechlorimonas*, *Borrelia*, *Denitrobacterium*, *Deferribacteres*.

Мілкий безполицевий обробіток зумовив розвиток наступних родів, які були відсутні за оранки і різноглибинного безполицевого обробітку: *Alkalimonas* (зумовлює амілолітичну активність) *Alishewanella*, *Shewanella*, *Rahnella*, *Idiomarina*, *Nitrosococcus*, *Azospirillum* (азотфіксувальні мікроорганізми); *Thalassospira* (продукують нітратредуктазу, індукують каталазну активність); *Methylobacillus* (активний компонент мікробних угруповань, який забезпечує повернення вуглецю метану у загальний пул органічної речовини), *Methylophilus*, *Rhodocyclus* (здатні асимілювати вуглекислоту повітря і брати участь у фотосинтезі). За оранки були наявні: *Thioalkalivibrio* (цикл сірки), *Vibrio*, *Pelobacter*, *Riemerella*.

Для різноглибинного безполицевого обробітку характерно формування мікробіоти з такими прокариотами: *Nanobacterium*, *Seralab*, *Phyllobacterium*, *Ochrobastrum*, *Pseudochrobastrum*, *Mesorhizobium* та *Bradyrhizobium* (симбіотрофні азотфіксатори), *Rubellimicrobium*, *Brevundimonas*, *Erythrobacter*, *Fluoribacter*, *Haliea* (3 види), *Enterobacter* (асоціативні азотфіксатори), *Rheinheimera*, *Alteromonas*, *Sterolibacterium*, *Azoarcus*, *Frateuria*, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Desulfoglaeba*, *Desulfobotulus*, *Spirobacillus*, *Bacteriovorax*, *Planctomyces*, *Coprothermobacter*, *Treponema*.

Філогенетичний аналіз дендрограм, побудованих на основі отриманих даних профілів методом tRFLP аналізу, свідчить про більше філотипове різноманіття ґрунтових мікроорганізмів за різноглибинного безполицевого обробітку як у шарі 0–5 см, так і 5–20 см.

Кількість видів ґрунтових мікроорганізмів, які виявлено за різних варіантів обробітку і удобрення чорнозему типового, наведено на рис. 5.

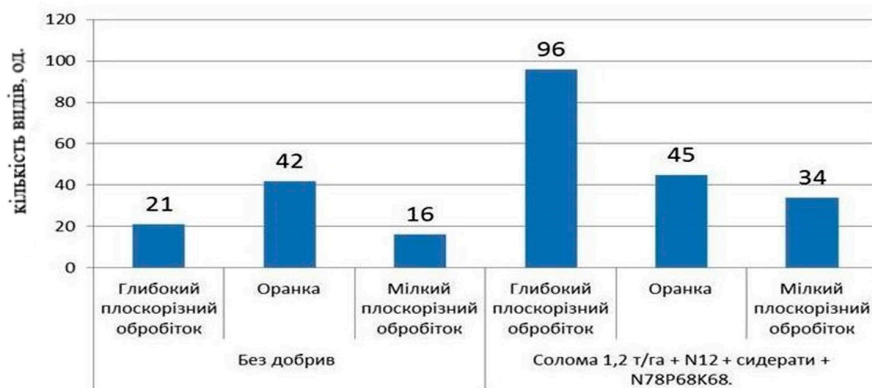


Рис. 5. Видове різноманіття ґрунтових мікроорганізмів, що формувалось за різних варіантів обробітку і удобрення чорнозему типового

Оцінка екологічних параметрів прокаріотного ґрунтового комплексу та їх зміни під впливом різних обробітків ґрунту і удобрення (табл. 2) свідчать про наступне: найвищі значення індексів різноманіття були отримані при застосуванні глибокого безполицевого обробітку на орґано-мінеральній системі удобрення із соломою і сидератами, що вплинуло на гумусонакопичення, де приріст за 14 років використання становив 0,26%. Тому найбільш стійкими вважаються системи, які мають високе біорізноманіття.

Таблиця 2

Вплив ґрунтозахисних обробітків на індекси домінування і мікробного біорізноманіття чорнозему типового

Варіант обробітку ґрунту	Варіант удобрення	Шар ґрунту, см	Індекс домінування	Індекс біорізноманіття
Різноглибинний безполицевий обробіток	Без добрив	0-5	0,54	0,67
		5-20	0,16	1,01
Оранка		0-5	0,12	1,11
		5-20	0,15	1,03
Мілкий безполицевий обробіток		0-5	0,12	0,92
		5-20	0,21	0,89
Різноглибинний безполицевий обробіток	Солома 1,2 т/га + N ₁₂ + сидерати + N ₇₈ P ₆₈ K ₆₈	0-5	0,12	1,38
		5-20	0,17	1,29
Оранка		0-5	0,16	1,01
		5-20	0,10	1,10
Мілкий безполицевий обробіток		0-5	0,17	0,96
		5-20	0,28	0,98

Обговорення. Аналіз біорізноманіття ґрунтового мікробіому чорнозему типового стаціонарного досліді ВП НУБіП України «Великоснітинське НДГ ім. О.В. Музиченка» показав, що у варіанті без добрив за ґрунтозахисних обробітків розвивалось у 2–3,8 рази менше видів бактерій порівняно з варіантом застосування оранки. При цьому безполицеві обробітки призводили до розвитку бактерій (до 70%), які не культивують-

ся на селективних середовищах. Але варіант без добрив за усіх обробітків ґрунту потребує постійного мікробіологічного моніторингу для припинення процесів втрати ґрунтової родючості. Органо-мінеральна система удобрення ґрунту формувала більші показники біорізноманіття ґрунтових мікроорганізмів (в 3–5,7 рази порівняно з варіантом без добрив).

Таким чином, обробітки ґрунту, впливаючи на надходження і розподіл поживних решток і добрив, фізико-хімічні і фізичні показники ґрунту, змінювали показники і будову філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів. Ширша і складніша будова філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів була за різноглибинного безполицевого обробітку у шарі 0–5 см і представлена 7 основними кластерами, які відповідають домінуючим генотипам, що відносяться до представників 98 видів, 31% з яких некультивовані, порівняно з варіантом оранки (7 кластерів, 57 видів, 40% некультивованих). Найбідніший мікробний комплекс порівняно з вищенаведеними варіантами обробітку сформувався за мілкого плоскорізного обробітку: 8 основних кластерів, 33 види, 18% некультивованих. Оранка на відміну від безполицевих обробітків зумовлювала диференціацію за кількістю видів мікроорганізмів: верхній (0–5 см) шар містив у 1,7 рази більше видів бактерій, ніж нижній (5–20 см). Кількість домінуючих генотипів прокаріот більша на 73% за оранки порівняно з варіантом мілкого плоскорізного обробітку.

Висновки. Системи землеробства, в першу чергу за рахунок обробітку ґрунту, у значній мірі впливають на філотипове різноманіття ґрунтових мікроорганізмів з найскладнішою його будовою за різноглибинного безполицевого обробітку. Оранка зумовила диференціацію за кількістю домінуючих генотипів у різних шарах ґрунту.

ОЦЕНКА МЕТАГЕНОМА ПРОКАРИОТНОГО КОМПЛЕКСА ЧЕРНОЗЕМА ПРИ АГРАРНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

*Н.В. Патыка, О.Л. Тонха, Т.И. Патыка,
М.О. Кироянц, С.В. Веретюк*

*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборона, 13, Киев, 03041, Украина*

Резюме

Цель. Комплексные исследования метагеномных ресурсов и структуры прокарриотного разнообразия, которое формируется в почвах при различном аграрном использовании (чернозем обыкновенный). **Методы.** Молекулярно-биологические – экстракция тотальной ДНК, электрофоретическое разделение продуктов амплификации 16s рРНК, визуальная детекция образцов ДНК, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, полевые – системы земледелия. **Результаты.** Установлено, что при почвозащитных системах (в т.ч. без удобрений) видовое богатство прокарриот чернозема обыкновенного в 2–3,8 раза меньше по сравнению со вспашкой, что обуславливает перманентное снижение почвенного плодородия. Обнаружено

разнообразное и трофически более сложное строение филотипической структуры почвенного бактериального микробиоценоза при разноглубинной безотвальной обработке (слой 0–5 см). Его основу составляют семь основных кластеров доминирующих генотипов, относящихся к представителям 98 видов, 31% из которых некультивируемые. При вспашке качественный состав почвенного микробиоценоза характеризовался семью кластерами и видовым богатством из 57 видов, из которых 40% некультивируемые. Применение вспашки приводит к дифференциации по количественному составу – в верхнем (0–5 см) слое в 1,7 раза больше видовое богатство бактериального комплекса, чем в нижнем (5–20 см). Качественный состав доминирующих генотипов прокариот богаче на 73% при применении вспашки по сравнению с вариантом мелкой плоскорезной обработки. **Выводы.** Системы земледелия, в первую очередь за счет обработки почвы, в значительной степени влияют на филотипическое многообразие почвенных микроорганизмов с самым сложным его строением при разноглубинной безотвальной обработке. Вспашка обусловила дифференциацию по количеству доминирующих генотипов в разных слоях почвы.

Ключевые слова: прокариотный комплекс, tRFLP анализ, чернозем, микробное разнообразие.

ESTIMATION OF PROKARYOTIC COMPLEX METHAGENOM OF CHERNOZEM UNDER AGRICULTURAL USE

*N.V. Patyka, O.L. Tonkha, T.I. Patyka,
M.O. Kirovants, S.V. Veretyuk,*

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
13, Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine*

Summary

Goal. Comprehensive studies of metagenomic resources and structure of prokaryotic diversity, which is formed in soils of different agricultural use (chernozem). **Methods.** Molecular-biological – extraction of total DNA, electrophoretic separation of products of 16s rRNA amplification, visual detection of DNA samples, analysis of restriction fragments length polymorphism, field – systems of agriculture. **Results.** It has been established that under soil protection systems (including without fertilizers), the species richness of prokaryotes of chernozem common in 2-3.8 times less than under plowing, which causes a permanent decrease in soil fertility. A diverse and trophically more complicated structure of the phylotypic structure of soil bacterial microbiocenosis has been revealed for a multi-depth fieldless cultivation (layer 0-5 cm). Basis of which are seven main clusters of dominant genotypes, which belong to representatives of 98 species, 31% of which are non-cultivated. For plowing, the qualitative composition of soil microbiocenosis was characterized by seven clusters, with 57 species, 40% of which were uncultivated. The application of plowing determines the differentiation in quantitative composition - in the upper (0-5 cm) layer 1.7 times the species richness of the bacterial complex, then in the lower (5-20 cm). The qualitative composition of the dominant prokaryotic genotypes is richer up to 73% under using of a plow compared with the option of shallow, flat-cut cultivation. **Conclusions.** Agricultural systems, primarily due to soil cultivation, have a

greater impact on the phylotypic diversity of soil microorganisms, and its most complex structure was for multidimensional fieldless cultivation. Plowing led to differentiation by the number of dominant genotypes in various soil lower.

Keywords: prokaryotic complex, tRFLP analysis, black soil, microbial diversity.

1. Patyka MV, Tanchik SP, Kolodjzhny OY, Ivanyk MF, Kryglov YV, Melnichyk MD, Patyka TI. [Formation of biodiversity and phylotypic structure of the eubacterial complex of chernozem typical in the cultivation of winter wheat.] Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2015; №11:163-171. Ukrainian.
2. Moskalevska YP, Patyka MV. [Structural-functional formation of the genome of the prokaryote of the rhizosphere of sugar beet in a typical black soil.] Collection of scientific works of NSC "Institute of Agriculture of NAAS". 2014; 1(2):69-76. Ukrainian.
3. Gadzalo YM, Patyka MV, Zarishnyak AS. [Agrobiology of the rhizosphere of plants.] In: monography Agricultural sciences. 2015. p.368. Ukrainian.
4. Patyka MV, Kolodjzhny OY, Ibatulin II. [Evaluation of the metagenome and detection of functionally significant polymorphisms of the prokaryotes of the soil using the pyrosequencing method]. Mikrobiol Z. 2016; 78(2):43-51. Ukrainian.
5. The quality of the soil. Methods of determination of organic matter: DSTU 4289: 2004.- [Effective from 2004-04-30]. State Committee of Ukraine. 2005. p.9, (National Standards of Ukraine).
6. Zvyagincev DG, Babeva IP, Zenova GM. [Biology of the soil.] MSU publishing house; 2005. Russian.
7. Ronaghi M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. In: Methods Mol. Biol. 2004; 255:211–219.
8. Tringe SG, Rubin EM. Metagenomics DNA sequencing of environmental samples. Nature reviews: Genetics. Nature Publishing Group; 2005; 6:805.
9. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus; 1987. p. 13-15.
10. Felske A, Wolterink A, Van Lis R. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66:3998–4003.
11. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. Nucleic Acids Research. 1998; 26(13):3309–3310.
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; 63:4516–4522.
13. Lu Guoqing, Moriyama, Etsuko. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. Briefings in Bioinformatics. 2004; (4):378–388.

Отримано 05.07.2018