

- Л.С. Галецкий, Г.Л. Сони́на, Т.М. Егорова // Прикладная геохимия. — М.: ИМГРЭ, 2001. — Вып. 2. — С. 306–316. — (Серия «Экологическая геохимия»).
7. Слободян Б.І. Цільове ландшафтно-геохімічне картографування масштабу 1:200 000 як складова комплексу Держгеолкарти-200 України / Б.І. Слободян, Т.М. Егорова, С.В. Клос // Сучасний стан і задачі розвитку регіональних геологічних досліджень: матеріали III науково-виробничої наради геологів-зйомщиків України (м. Рівне. 8–12 вересня 2005 р.), — К.: УкрДГРІ, 2005. — С. 233–235.
 8. Требования к производству и результатам многоцелевого геохимического картирования масштаба 1: 200 000 / А.А. Головин, Н.Н. Москаленко, А.И. Ачкасов и др. — М.: ИМГРЭ, 2002. — 92 с.
 9. Адаменко О. Екологічне картування: [підручник] / О. Адаменко, Г. Рудько, Л. Консевич. — Івано-Франківськ: Вид-во ІМЕ, 2003. — 580 с.
 10. Егорова Т.М. Биогеохимическое районирование сельскохозяйственных земель Украины: проблемы и решения / Т.М. Егорова // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. — Саратов, 2014. — № 4. — С. 16–18.
 11. Егорова Т.М. Геохімічні властивості ландшафтів як фактор екологічної безпеки земель сільськогосподарського призначення / Т.М. Егорова // Збалансоване природокористування. — 2014. — № 1. — С. 184–189.
 12. Фурдичко О.І. Основи управління агроландшафтами України / О.І. Фурдичко, А.П. Стадник. — К.: Аграрна наука, 2012. — 384 с.
 13. Тараріко О.Г. Основні фактори сталого розвитку агроекологічних систем і сільськогосподарських ландшафтів / О.Г. Тараріко // Проблеми сталого розвитку України. — К.: Лібра, 1998. — С. 254–268.
 14. Чертко Н.К. Геохимия агроландшафтов Белоруссии и их оптимизация: автореф. дис. ... д-ра геогр. наук: 11.00.01 / Н.К. Чертко. — М.: 1991. — 40 с.
 15. Егорова Т.М. Эколого-геохимические критерии оценки и районирования агроландшафтов / Т.М. Егорова // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. — 2014. — № 1. — С. 118–122.

УДК 631.46 : 579.64

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МЕТАГЕНОМА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ ВНЕСЕНИИ СОЛОМЫ В ПОЧВУ

А.Ю. Колодяжный
аспирант

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Н.В. Патыка

доктор сельскохозяйственных наук, профессор
заведующий отделом сельскохозяйственной микробиологии и физиологии растений

ННЦ «Институт земледелия НААН Украины»

О.В. Орлова

кандидат биологических наук
и.о. заведующего лабораторией микробных экотехнологий

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН

Проведено порівняльний аналіз метагеномного складу прокариотного комплексу дерново-підзолистого ґрунту. Виявлено структуру мікробного комплексу та особливості розподілу чисельності мікроорганізмів по профілю ґрунту (текстура). Вивчено позитивний вплив неглибокого внесення соломи на формування функціональної структури мікробоценозу дерново-підзолистого ґрунту.

Ключові слова: *метагеном прокариот, функціональна структура, T-RFLP-аналіз, мікробний комплекс, біорізноманіття, дерново-підзолистий ґрунт, солома.*

Почва является основной средой, формирующей биологическое разнообразие живых организмов, а микроорганизмы — основным источником генетического разнообразия, которое обладает широчайшим видовым и функ-

циональным разнообразием [1]. Структура и гетерогенность почвы обуславливает высокую микроразнообразие развития микробоценозов, что непосредственно влияет на проявление их функциональной активности [2].

Имея мощный ферментативный аппарат, микробиота играет исключительно важную роль в трансформации органической материи и формировании плодородия почв [3].

В современном аграрном производстве побочная продукция растениеводства привлекает всё большее внимание для использования. Остаточное количество нетоварной части урожая (соломы) занимает значительные площади и большие объемы, так как возделывание зерновых культур является стратегическим и широкомасштабным. В настоящее время очень распространённым и актуальным является использование соломы в качестве биологического удобрения и энергетического материала, который запускает трофические цепи и участвует в развитии процессов почвообразования. Она является основным источником углерода и других органических веществ, которые активно трансформируются почвенными микроорганизмами [4].

Формирование соответствующего микробного комплекса с определенной функциональной активностью, участвующего в трансформации органического вещества, в значительной мере зависит от способов обработки и агрегатного состава почвы [5]. Поэтому важной задачей экологической микробиологии является комплексная оценка сложных связей между микробными ценозами и средой их обитания в разрезе структуры, текстуры (закономерности распределения численности и групп по горизонтам почвы) и функциональной направленности.

Целью работы было изучить влияние глубины заделки соломы злаковых культур на особенности формирования метагенома, текстуры и структуры микробного комплекса при её разложении в дерново-подзолистой почве.

Для решения поставленных задач проводился модельный опыт (сосуды на 1 кг почвы) с внесением в хорошо окультуренную дерново-подзолистую почву ($C_{гум.}$ 4,02 %, $N_{общ.}$ 0,316 %, $pH_{сол}$ 5,63) измельченной соломы ржи разными способами (поверхностно, в слое 0–3 и 9–12 см), что соответствует общепринятым системам земледелия с последующим компостированием в течение 2-х месяцев и дальнейшим выращиванием растений яровой пшеницы на протяжении 1 месяца.

Изучение численности почвенных микроорганизмов проводили методом посева почвенных суспензий на твёрдые питательные среды [6]. Качественный состав микробного комплекса изучали на основе представленности морфолого-культуральных типов. Функциональную направленность микробиологических процессов определяли на основе коэффициентов минерализации, олиготрофности, педотрофности,

микробной трансформации органического вещества [7].

Активность функционирования микробного сообщества определяли по скорости эмиссии CO_2 (мг $C-CO_2$ /кг сутки) методом субстрат-индуцированного дыхания и остаточному содержанию соломы в почве [8].

Анализ метагеномного состава и фило-типичной структуры прокариотного комплекса проводили методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) [9]. Выделение и очистку ДНК почвенных организмов проводили согласно методических рекомендаций [10]. Амплификацию фрагмента 16S-pPHK проводили с флуоресцентно-меченым праймером *EU3 (63f (WellRed)/1494r)*. 1 мкл амплификата обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HaeIII* та *MspI*. Детекцию интенсивности флуоресценции определяли в автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 8000.

Для анализа T-RFLP профилей на соответствие предполагаемым таксономическим кандидатурам использовали программу Fragment Sorter. На основе идентифицированных фило-типов по 16S-pPHK проводили филогенетический анализ с помощью компьютерной программы Vector NTI [11].

Анализ метагеномного состава прокариот показал влияние особенностей глубины заделки соломы на микробный состав (рис. 1). Показано значительное количество бактерий, не культивируемых на селективных питательных средах, особенно в контрольном варианте без соломы. Так, в почве без внесения соломы прокариотическое разнообразие представлено филами *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* и *Firmicutes*, среди которых 71 % составили некультивируемые организмы.

Внесение соломы в почву способствует увеличению бактериального разнообразия и снижению доли некультивируемых прокариот. При заделке соломы на глубину 9–12 см разнообразие возрастало в основном за счёт филов *Proteobacteria*, которая объединила 10 порядков почвенных прокариот. Наиболее существенное возрастание разнообразия почвенного метагенома выявлено при неглубокой (0–3 см) заделке соломы, что свидетельствует о повышении функциональной активности микробиома.

Топология распределения прокариотных фило-типов свидетельствует о наличии представителей филов *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*, представленность которой была наивысшей и включала 13 порядков микроорганизмов. Доля некультивируемых прокариот в данном варианте составила 20 %.

В результате определения численности бактерий и микромикетов по горизонтам почвы

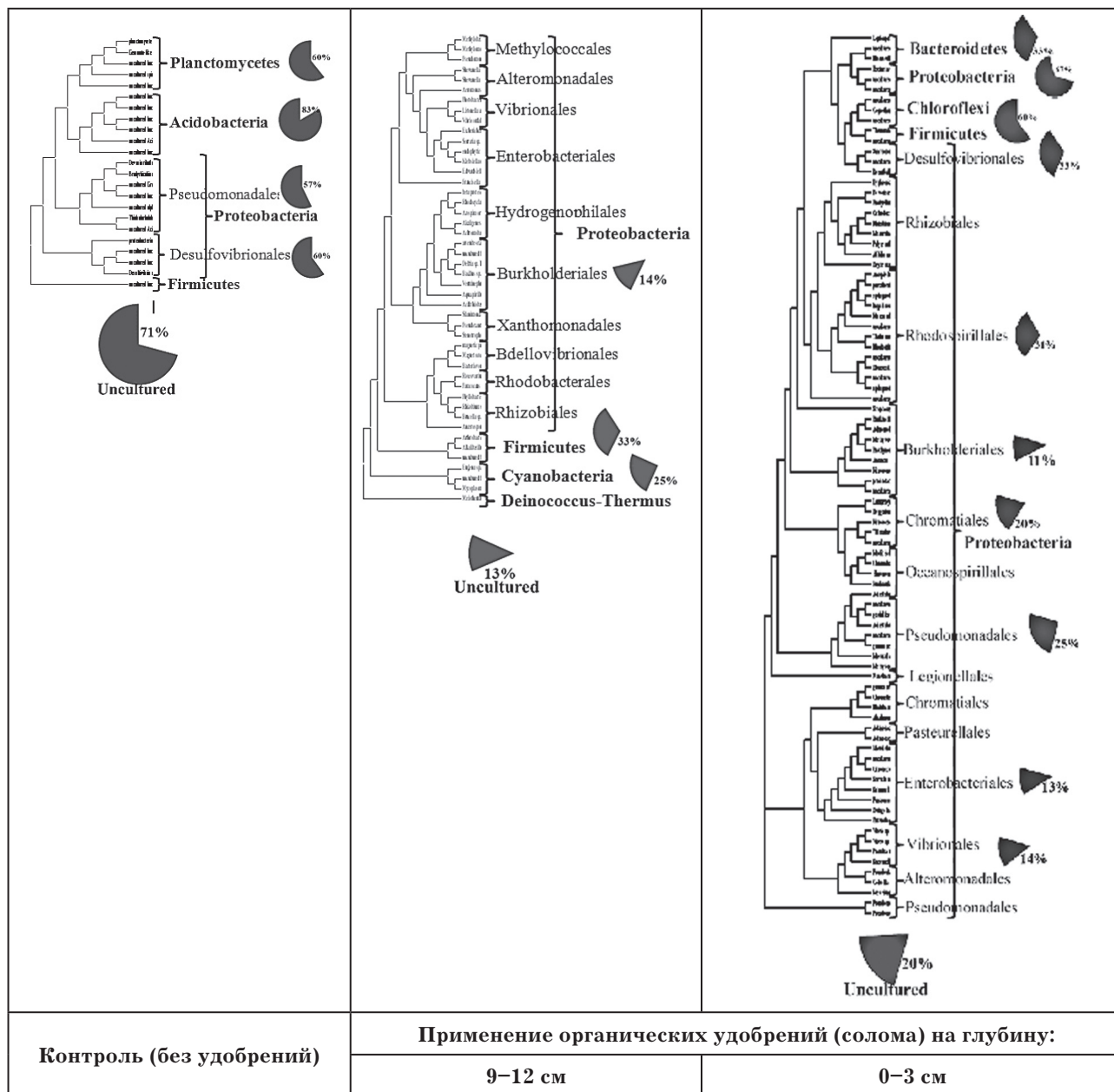


Рис. 1. Влияние способов заделки соломы на метагеном и филотипический состав прокариот дерново-подзолистой почвы

выявлено разницу между ними во всех вариантах опыта (рис. 2). В контрольном образце почвы (без соломы) численность бактерий составила $34,52 \pm 2,59$ млн КОЕ/г абсолютно сухой почвы в верхнем горизонте (0–6 см) и $7,79 \pm 0,70$ млн — в нижнем (6–12 см). Численность микромицетов при этом составила $34,44 \pm 2,78$ тыс. и $62,73 \pm 3,94$ тыс. соответственно.

При внесении соломы на поверхность почвы численность бактерий и микромицетов в горизонте 0–6 см снижалась до $11,71 \pm 0,99$ млн и $8,95 \pm 0,80$ тыс.

При заделке соломы на глубину 0–3 см численность бактерий увеличилась в верхнем горизонте почвы до $36,33 \pm 1,20$ млн, в нижнем — до $22,53 \pm 0,78$ млн, что свидетельствует о движении питательных веществ по профилю почвы, которые обеспечивают трофические связи. Количество микромицетов в данном варианте составило $22,71 \pm 2,26$ тыс. в верхнем горизонте и снизилось в нижнем (6–12 см) до $14,41 \pm 1,48$ тыс.

Заделка соломы на глубину 9–12 см способствовала увеличению численности бактерий до

22,42±1,42 млн по сравнению с контролем, микромицетов — до 55,42±2,94 и 47,50±3,74 тыс. в соответствии с горизонтами почвы по сравнению с заделкой соломы на глубину 0–3 см.

Оценка численности основных физиологических групп микробного комплекса показала, что в почве без внесения соломы численность аммонификаторов составила 8,20±0,80 млн КОЕ/г почвы, использующих минеральный азот (аммилолитических) — 8,73±0,97 млн, олиготрофов — 15,09±1,16 млн, педотрофов — 20,09±1,77 млн, целлюлозолитических — 43,05±6,96 тыс (рис. 3). При внесении соломы наблюдается существенное изменение структуры микробного комплекса почвы.

Так, поверхностное внесение соломы способствует увеличению численности аммонификаторов (17,32±0,55 млн), аммилолитических (38,15±1,42 млн), незначительно целлюлозолитических микроорганизмов (65,07±7,97 тыс.) и приводит к возрастанию олиготрофов и педотрофов (33,67±3,87 и 34,73±2,93 млн). Заделка соломы на глубину 0–3 см положительно влияет на структуру численности физиологических групп микробного ценоза и способствует значительному увеличению целлюлозолитических микроорганизмов (135,37±8,56 тыс.). Количество аммонификаторов и аммилолитических микроорганизмов увеличивается в 2,5 раза, а олиготрофов и педотрофов снижается в 1,5 раза по сравнению с контролем.

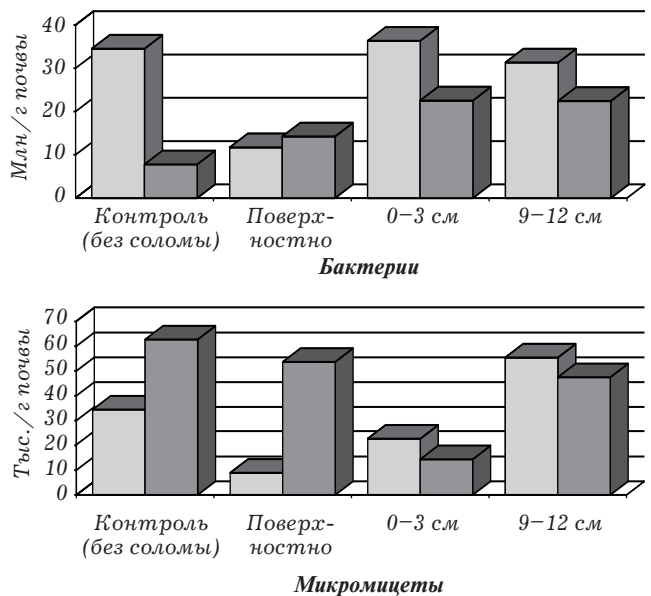


Рис. 2. Влияние способов заделки соломы на численность микроорганизмов в разных горизонтах дерново-подзолистой почвы: □ 0–6 см; ■ 6–12 см

В таких условиях происходит активная трансформация органического материала, накопление питательных веществ и минерального азота, который иммобилизуется бактериями. При заделке соломы на глубину 9–12 см чис-

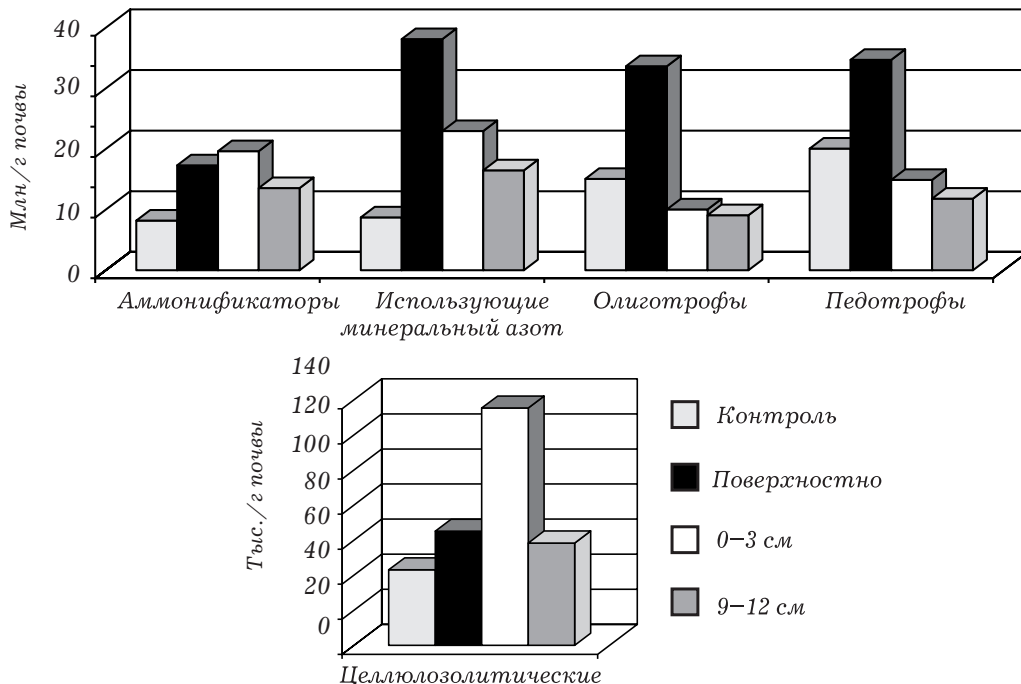


Рис. 3. Численность основных физиологических групп микробного комплекса при заделке соломы в почву

Таблиця 1

Влияние способов заделки соломы на направленность микробиологических процессов дерново-подзолистой почвы

Глубина заделки соломы, см	Коэффициент минерализации	Коэффициент педотрофности	Коэффициент олиготрофности	Коэффициент микробной трансформации органического вещества
Контроль (без соломы)	1,07	2,45	0,89	64,63
Поверхностно	2,20	2,00	0,61	103,25
0–3	1,17	0,76	0,24	139,16
9–12	1,22	0,87	0,30	99,04

ленность физиологических групп микроорганизмов изменилась незначительно.

Сравнительная оценка функциональной направленности почвенных микробиологических процессов (табл. 1) с использованием индексов показала, что внесение соломы на глубину 0–3 см способствует активной микробной трансформации органического вещества, коэффициент которой был наивысшим и составил 139,16 (в контрольной почве — 64,63). В данных условиях улучшается трофический режим почвы и происходит увеличение количества легкоусвояемых веществ, о чём свидетельствуют показатели минерализации (1,17), педотрофности (0,76) и олиготрофности (0,24). При внесении соломы поверхностно они составили 2,20, 2,00 и 0,61 соответственно, а при заделке на глубину 9–12 см — 1,22, 0,87 и 0,30.

Качественный состав микробного комплекса, который сформировался в процессе трансформации соломы при разных способах её заделки в почву показал, что внесение соломы способствует увеличению биоразнообразия бактериальной и грибной микрофлоры (рис. 4). Так, увеличение индекса разнообразия Шеннона для бактерий и микровицетов распределилось следующим образом: контроль (1,094; 0,745) → поверхностно (1,285; 1,018) → 0–3 см (1,330; 1,148) → 9–12 см (1,413; 1,241) соответственно. Следует отметить равномерное и параллельное увеличение биоразнообразия бактериальной и грибной микрофлоры по вариантам опыта.

Активность функционирования микробного сообщества в соответствии со скоростью эмиссии CO₂ (мг С-CO₂/кг сутки) в контрольной почве составило 33,4±4,1. «Дыхание» почвы возросло при внесении соломы по всем вариантам, наивысшим значение было при заделке соломы на глубину 0–3 см (42,4±2,6), что свидетельствует об увеличении микробиологической активности (рис. 5).

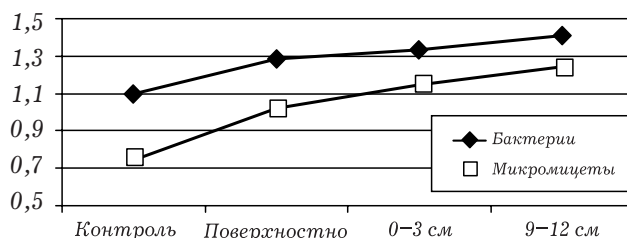


Рис. 4. Влияние способов заделки соломы на разнообразие (индекс Шеннона) микробного комплекса дерново-подзолистой почвы

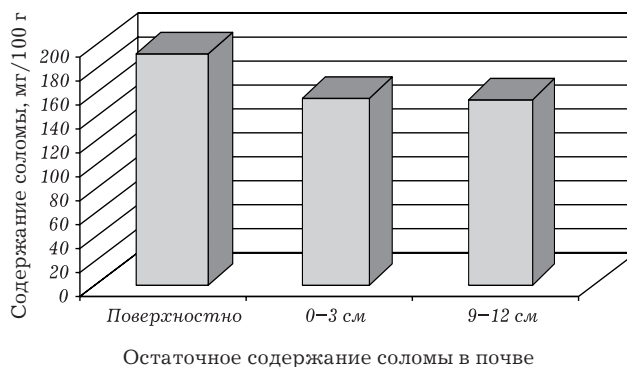
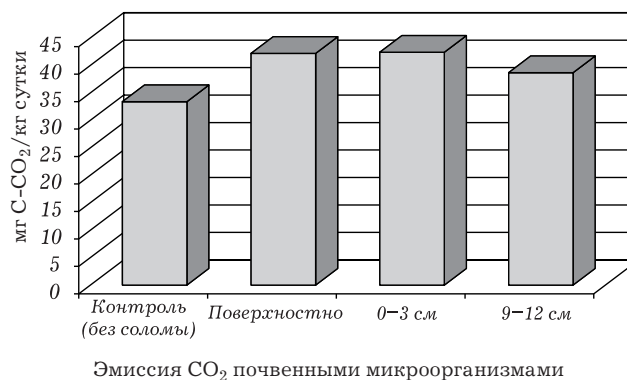


Рис. 5. Показатели микробиологической активности при разложении соломы в дерново-подзолистой почве

Степень минерализации соломы по остаточному содержанию её в почве (внесено 300 мг соломы/100 г) при заделке на глубину 0–3 см составила $156,2 \pm 18,2$ мг/100 г, содержание гумуса в данном варианте возросло на 0,28 % по сравнению с контролем и было наивысшим из вариантов — $4,02 \pm 0,02$ %.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований выявлена структура и текстура микробного комплекса, участвующего в трансформации соломы, его метагеномный состав, что может служить основой для определения функциональных особенностей микробиома. Наибольшее увеличение разнообразия почвенного метагенома наблюдалось при заделке соломы на глубину 0–3 см. При этом численность бактерий возрастала и была наивысшей в верхнем и нижнем горизонтах почвы, а микромицетов значительно снижалась. Заделка соломы на глубину 0–3 см способствовала увеличению численности целлюлозолитических микроорганизмов ($135,37 \pm 8,56$ тыс.), аммонификаторов и микроорганизмов, использующих минеральный азот, в 2,5 раза и снижению численности олиготрофов и педотрофов в 1,5 раза. В данных условиях выявлена функциональная активность и гомеостаз микробного ценоза, благодаря которому оптимизируются трофические режимы почвы, что является основой для биотехнологий по улучшению систем земледелия и управления плодородием почв в целом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патыка Н.В. Прокариотические микроорганизмы почвы: структура и функциональное разнообразие / Н.В. Патыка, Ю.В. Круглов, Е.В. Шеин // Тезисы докл. XIII съезда общества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского. — Одеса, 2013. — С. 46.
2. 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.
3. Microbial Diversity in Soils / B. Giri, P. Huong Giang, R. Kumari [et al.] // Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. — 2005. — P. 19–49.
4. Сорокин И.Б. Влияние соломы и зеленых удобрений на агрохимические свойства, биологическую активность и гумусное состояние серых оподзоленных почв: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. / И.Б. Сорокин. — Томск, 2003. — 19 с.
5. Иутинская Г.А. Почвенная микробиология / Г.А. Иутинская. — К.: Аристей, 2006. — 284 с.
6. Практикум по микробиологии: [учеб. пособие] / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. — М.: Издат. центр «Академия», 2005. — 608 с.
7. Лабутова Н.М. Методы изучения почвообитающих микроорганизмов: [учеб. пособие] / Н.М. Лабутова. — СПбГУ, 2008. — С. 13–16.
8. Carter M.R. Soil Sampling and Methods of Analysis / M.R. Carter, E.G. Gregorich. — Second Edition — Taylor & Francis Group, LLC, 2008. — P. 516–579.
9. Ursel M. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities / M. Ursel, E. Schütte, Z. Abdo [et al.] // Applied Microbiol. Biotechnol. — 2008. — P. 365–380.
10. Андронов Е.Е. Влияние внесения генетически модифицированного штамма *Sinorhizobium meliloti Ach_5* на структуру почвенного сообщества микроорганизмов / Е.Е. Андронов, С.Н. Петрова, Е.П. Чижевская и др. // Микробиология. — 2009. — № 4. — Т. 78. — С. 525–534.
11. Патыка Н.В. Особенности филогенетических профилей прокариотических микроорганизмов подзолистых почв / Н.В. Патыка, Ю.В. Круглов, В.Ф. Патыка // Физиология и биохимия культурных растений. — 2009. — № 3. — Т. 41. — С. 248–254.

Новини Новини

Новини • Новини • Новини

ВСЕСВІТНІЙ ДЕНЬ БОРОТЬБИ З ОПУСТЕЛЮВАННЯМ ТА ПОСУХАМИ

17 червня відзначається міжнародною спільнотою як Всесвітній день боротьби з опустелюванням та посухами. Цього року він проходить під гаслом: «Землі належать майбутньому! Дозволь клімату підтвердити це!». На сьогодні, кількість землевласників та землекористувачів в Україні перевищує 25 млн. осіб. Тому розв'язання проблем деградації земель та опустелювання можливе лише за умови поєднання зусиль органів виконавчої влади та місцевого самоврядування, наукових установ та експертів, неурядових організацій з тими, хто безпосередньо господарює на землі.