

В.А. Думова<sup>1</sup>, Н.В. Патыка<sup>1</sup>, Ю.В. Круглов<sup>1</sup>, В.Ф. Патыка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, e-mail: n\_patyka@mail.ru

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

## ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ КОМПЛЕКСА ПРОКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВ

*Используя метод клонирования ДНК, проведен сравнительный анализ комплекса прокариотных микроорганизмов подзолистых почв при сверхдлительном возделывании льна долгунца и в чистом паре. Проведена оценка биоразнообразия почвенных прокариотов, на основе которых можно судить о почвенных микробиологических сообществах, сформировавшихся под влиянием различных агроприемов. Установлено, что, в конечном счете, бессменная культура растений способствует обеднению генетических ресурсов микробиоты почв и изменению ее качественного состава.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: почва, лен-долгунец, ДНК почвенных микроорганизмов, биоразнообразие.*

Известно, что микроорганизмы являются неотъемлемым гомеостатическим составляющим компонентом почвы, который осуществляет и определяет в ней важнейшие функции трансформации веществ и энергии. Микробиоте принадлежит важная роль в функционировании различных экосистем. Развитию детального изучения микробного биоразнообразия в окружающей среде препятствовали ограниченные прикладные возможности. За прошедшее десятилетие в области биологии широкое развитие получили молекулярно-биологические методы, при помощи которых появилась возможность преодолеть проблемы, возникающие в практике классических микробиологических методов исследований [3, 10].

На сегодняшний день многие работы базируются на исследованиях нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), непосредственно извлеченных из образцов различных почв [3, 4]. При помощи ПЦР с соответствующими филогенетическими маркерами (16S рРНК, 18S рРНК и др.) проводится определение генов, кодирующих малую или большую субъединицу рибосомальной РНК, что способствует дальнейшему развитию исследований разнообразных изолятов и некультивируемых видов микробных сообществ биогеоценозов [5]. Следует отметить, что сравнительный анализ природных микробных сообществ способствует ускоренному изучению их структурно-функциональных особенностей, учитывая специфичность уникальных или доминирующих групп при определенных условиях [1].



### Матеріали і методи

Изучение почвенных микробных сообществ осуществлялось на базе сверхдлительного (с 1912 года) стационарного полевого опыта Российского государственного аграрного университета Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева. Почва дерново-слабоподзолистая, старопашотная кислая и запыляющая (по классификации ФАО-Podsolluvisol). Согласно данным гранулометрического анализа, в пахотном (0–20 см) слое почвы содержалось фракций менее 0,01 мм 22,0 % [9].

Образцы почв отбирались осенью после сбора урожая льносоломки (*Linum usitatissimum* L) из верхнего 15 см пахотного горизонта. Отбор почвенных образцов для микробиологического анализа осуществлялся из следующих вариантов опыта:

Бессменная культура	1.	Лен-долгунец (контроль)
	2.	Лен-долгунец+ N <sub>100</sub> P <sub>150</sub> K <sub>120</sub>
	3.	Лен-долгунец + навоз
Севооборот	4.	Лен-долгунец (без удобрений)
Чистый пар	5.	Без удобрений

ДНК почвенных микроорганизмов экстрагировали методом, описанным в работах Doyle J.J., Doyle J.L. [4, 5]. После визуальной детекции полученных образцов ДНК после электрофоретического разделения в однопроцентном агарозном геле (рис. 1), проводили очистку полученной почвенной ДНК от примесей гуминовых кислот по D. Moreira [8].

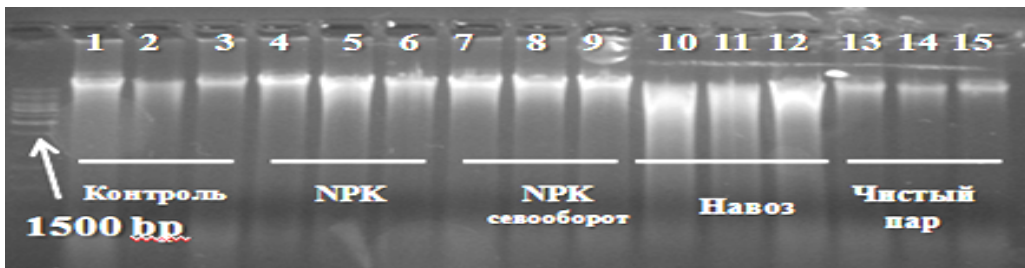


Рис. 1. Электрофореграмма тотальной ДНК почвенных организмов  
Маркер молекулярной массы (1500 bp), 2–15 повторности вариантов отбора

Fig. 1. Electrophoregram of soil organisms total DNA  
Molecular mass marker (1500 bp), 2–15 variants of choice repeatability

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили зубактериальным праймером Eu3. Полученный таким образом ПЦР продукт разрезали рестриктазой *HaeIII*. Визуальную детекцию фрагментов из библиотеки клонов (рис. 2-3) полученных образцов ДНК осуществляли после электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. После этого проводили идентификацию нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 8000. Видовую принадлежность полученных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК проводили в соответствии с международной базой данных NSBI и GENBANK.

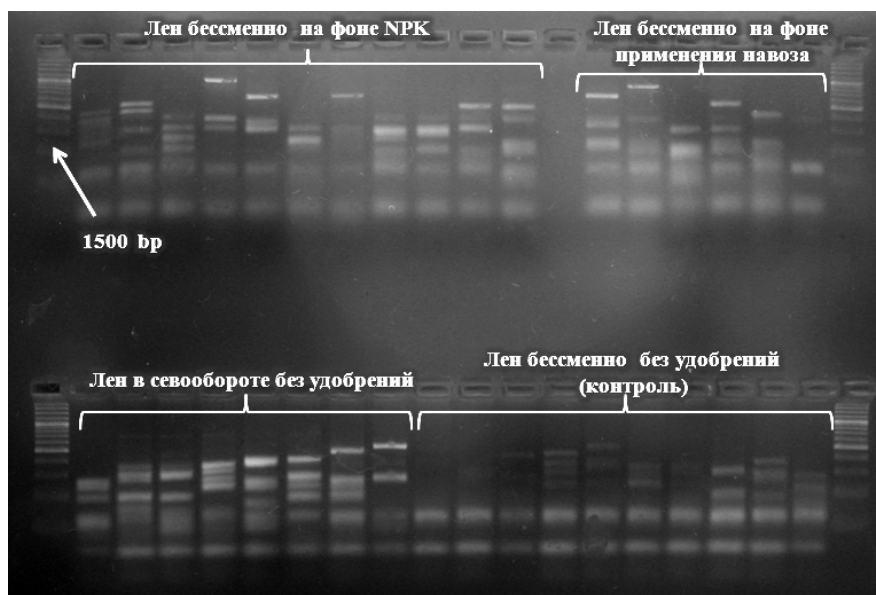


Рис. 2. Электрофореграмма рестрикции (*Hae III*) клонов 16S рРНК полученных из тотальной ДНК почвенных организмов в различных вариантах полевого опыта

Fig. 2. Electrophoregram of clones 16S рRNA restrictions (*Hae III*) obtained from soil organisms total DNA in different variants of the field experiment

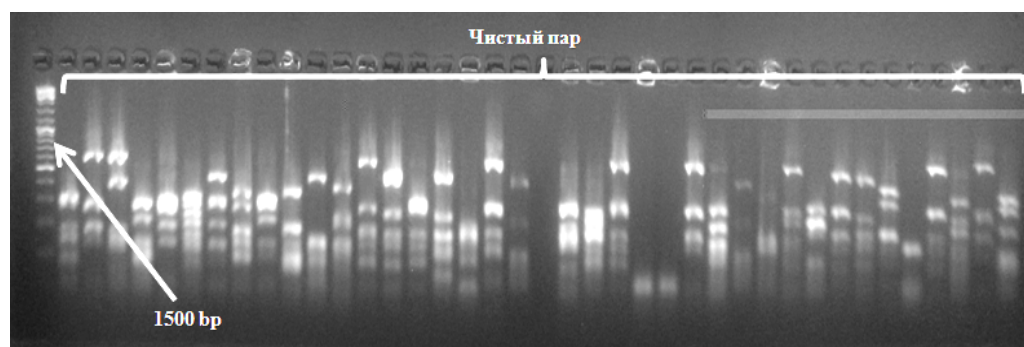


Рис. 3. Электрофореграмма рестрикции (*Hae III*) клонов 16S рРНК полученных из тотальной ДНК почвенных организмов в варианте чистый пар полевого опыта

Fig. 3. Electrophoregram of clones 16S рRNA restrictions (*Hae III*) obtained from soil organisms total DNA in the variant bare fallow of the field experiment

### Результаты и их обсуждение

Исследованиями установлено, что при возделывании льна-долгунца на дерново-подзолистых почвах (табл.) при бессменном возделывании, севообороте и чистом паре, сформировались микробоценозы, доминирующее положение в которых заняли разные представители бактерий. Молекулярно-генетический анализ состава этих сообществ в варианте бессменного возделывания льна-долгунца выявил численное доминирование представителей филогенетических групп *Planctomycetes* и *beta Proteobacteria*.

Список доминантов является одним из репрезентативных показателей таксономической структуры микробных комплексов, тесно связанным с типом агроэкосистемы. Встречаемость *Planctomycetes* и *beta Proteobacteria* составила от 5,7 до 11,5 %.

В севообороте доминировали представители *Actinobacteria* – 10 % и некультивируемые бактерии – 13 %. Большой процент некультивируемых бактерий выявлен в варианте чистый пар – 37,1 %.

При изучении влияния культуры льна-долгунца и чистого пара на видовой состав почвенных бактерий отмечено, что при бесменном возделывании льна широко представлены некультивируемые бактерии *Planctomycetes*, *beta Proteobacteria*, *alpha Proteobacteria*, уровень сходства которых составляет 95–99 %.

В варианте чистого пара некультивируемые виды составляли 4,7–23 % при уровне их сходства – 85–94 %. В севооборотном варианте с применением НРК уровень сходства бактерий рода *Actinobacteria* составил 97 %, а некультивируемых бактерий – 98 %, что подтверждает представленные ранее данные о сложившихся гомеостатических взаимосвязях в почвенном микробном комплексе.

Таблица

**Состав доминирующих фило типов бактерий в почве под культурой льна-долгунца и чистым паром**

Table

**Flex-fibre culture and bare follow effect on the composition of dominated bacteria filotypes in soil**

Вариант опыта	Филотип прокариот	Сходство, %	Представленность, %
лен бесменно	Uncultured planctomycetes clone A12_MO02 EF220755.1	95	11,5
	Uncultured planctomycetes bacterium clone 711 EU370852.1	95	5,7
	Uncultured beta proteobacterium clone GASP-KA1W2_B02 EU297276.1	97	11,5
	Uncultured alpha proteobacterium clone EB1032 AY395351.1	99	5,7
севооборот НРК	Uncultured actinobacterium clone GASP-KA1S1_D02 EU296947.1	97	10
	Uncultured bacterium clone GAS19 FJ178020.1	98	13
чистый пар	Uncultured bacterium clone H79S2_12b11 EU451814.1	94	23
	Uncultured bacterium clone 1790b-16 AY917485.1	89	4,7
	Uncultured bacterium clone ST_37 AM921478.1	85	4,7
	Uncultured bacterium clone sb8 EU327149.1	87	4,7

Таким образом, методом молекулярно-генетического анализа было установлено биоразнообразие прокариотического комплекса дерново-подзолистых почв при бесменном возделывании льна-долгунца, севообороте и чистом паре, что позволяет научно-обоснованно судить о земледельческих агроприемах и управлять ими.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 07-04-13527 офу-ц.*



## ЛІТЕРАТУРА

1. *Длительному* полевому опыту ТСХА 90 лет: итоги научных исследований /Под ред. Сафонова А.Ф. — М.: Изд-во МСХА, 2002. — 246 с.
2. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd. ed. (Ed. D.R. Boone, R.W. Castenholz) Springer-Verlag, N.Y., Berlin, Heidelberg. — 2001. — Vol. 1. — 721 p.
3. *Buckley D.H., Schmidt T.M.* The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation //Microbial Ecology. — 2001. —Vol. 42. — P. 11 — 21.
4. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue //Focus. — 1987. — Vol. 12. — P. 13-15.
5. *Felske, A., Wolterink A., Van Lis R., De Vos W.M., Akkermans A.D.L.* Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes //Applied and Environmental Microbiology. — 2000. —Vol. 66. — P. 3998-4003.
6. *Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R.* Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. — 1998. — P. 173-198.
7. *Moreira D.* Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations //Nucleic Acids Research. — 1998. — Vol. 26. — N 13. — P. 3309-3310.
8. *Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J.* The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences //Adv. Microbial. Ecol. — 1986. — Vol. 9. — P. 1-55.
9. *Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L.* High diversity in DNA of soil bacteria //Applied and Environmental Microbiology. -1990. —Vol. 56. — P. 782-787.
10. *Widmer F., Fliessbach A., Laczko E., Schulze-Aurich J., Zeyer J.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM-analyses //Soil Biology & Biochemistry. - 2001. —Vol. 33. — P. 1029-1036.

<sup>1</sup>В.А. Думова, <sup>1</sup>М.В. Патица, <sup>1</sup>Ю.В. Круглов, <sup>2</sup>В.П. Патица

<sup>1</sup>Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкін, шосе Подбельского, 3, e-mail: n\_patyuka@mail.ru

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

## ВИВЧЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ КОМПЛЕКСУ ПРОКАРІОТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ПІДЗОЛИСТИХ ҐРУНТІВ

### Реферат

Використовуючи метод клонування ДНК, проведено порівняльний аналіз комплексу прокаріотних мікроорганізмів підзолистих ґрунтів при надтривалому вирощуванні льону-довгунця та в чистому парі. Виявлено та проведено оцінку біорізноманіття ґрунтових прокаріот, на основі яких можна судити про ґрунтові мікробіологічні угруповання, що сформувалися під впливом різних агротехнічних заходів. Встановлено, що беззмінна культура рослин сприяє збідненню генетичних ресурсів ґрунтової мікробіоти і зміні її якісного складу.

К л ю ч о в і с л о в а: льон-довгунець, прокаріотні мікроорганізми, ДНК ґрунтових мікроорганізмів, біорізноманітність.



**<sup>1</sup>V.A. Dumova, <sup>1</sup>N.V. Patyka, <sup>1</sup>Yu.V. Kruglov, <sup>2</sup>V.F. Patyka**

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, RAAS, 196608, Russia,  
St. Petersburg, Puskin, Podbelsky str., 3.

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU of Ukrain, Zabolotnoho str.,  
154, Kiev, D03680, Ukraine.

## **STUDYING BIODIVERSITY OF THE PROCARIOTIC MICROORGANISMS COMPLEX OF PODSOLIC SOILS**

### **Summary**

Using the method of DNA cloning the comparative analysis of the complex procaryotic microorganisms of podsolic soils is carried out for a long term cultivation of flax and in bare fallow. The method has allowed to reveal and identify the species belonging, to estimate the biodiversity of soil procaryots on which basis it is possible to judge the soil microbiological communities generated under the influence of various agrotechnologies. It is established that finally the permanent culture of plants causes genetic resources degradation of soils microflora and basic change of its qualitative structure. It is directly connected with decrease in stability of plants to natural and anthropogenic stresses. Crop succession of agricultural crops in the crop rotation link causes specific updating of microcenosis.

**Key words:** flax-fibre, procaryotic microorganisms, soil organisms DNA, biodiversity.

