

Н. В. Патыка, Ю. В. Круглов, И. А. Тихонович, В. Ф. Патыка

Профиль полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (*tRFLP*) комплекса прокариотных микроорганизмов подзолистых почв

(Представлено академиком НАН Украины В. С. Подгорским)

Методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (tRFLP) проведено порівняльний аналіз комплексу прокариотних мікроорганізмів підзолистих ґрунтів при довготривалому вирощуванні льону-довгуня, з урахуванням індексу генетичної різноманітності.

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, но развитию детального изучения микробного биоразнообразия в окружающей среде препятствовали ограниченные прикладные возможности. Это, в свою очередь, создавало дополнительные сложности для микробиологов, поскольку при оценке любым из известных методов большого количества разнообразных организмов и получении представлений относительно их экологической изменчивости необходимо проанализировать достаточно большое количество образцов. За прошедшее десятилетие в области биологии широкое развитие получили молекулярные методы, позволяющие преодолеть проблемы, возникающие в практике классических микробиологических методов исследований. Использование молекулярных методов в почвенной микробиологии показало, что во многих естественных условиях обитания биоразнообразие и сложность микробных сообществ, так же как и их пространственно-временная разнородность, гораздо более обширны, чем первоначально ожидалось.

Доминирующая часть микробных сообществ в почве представлена сложным комплексом различных морфотипов и физиологических групп. Общепринятая почвенная микробиология изучает только те немногие микробные сообщества (таксономические группы), которые культивируются на селективных средах. Для количественной оценки микробиологических особенностей почв, как правило, используются методы определения микробной биомассы, количества выделенного углекислого газа, но практика показывает, что эти методы не могут дать полной информации об основе почв, т. е. структуре микробных сообществ. То же самое можно сказать в отношении анализа уровня сообществ, при котором используется метод “стекло обростания”.

Структура микробных сообществ является неотъемлемой составной частью детальной характеристики почв, включая определенные процессы и факторы, прямо или косвенно влияющие на их особенности.

Нам известно не более 10% того, что имеется в мире микроорганизмов. Например, количественная оценка бактериальных разновидностей в почве показала, что их число насчи-

тывает более чем 4000 разновидностей (биовариантов) на 30 г почвы, это свидетельствует о сложности и важности изучения межбиотических взаимодействий всех компонентов природных сообществ, включая растения, а также применяемые агроприемы [1–3].

Использование молекулярно-генетических методов в микробиологии расширило возможности исследований и привело к формированию нескольких направлений в систематике микроорганизмов:

- создание филогенетической систематики микроорганизмов;
- идентификация штаммов с использованием филогенетической и фенотипической информации;
- выявление микроорганизмов из окружающей среды без их культивирования.

На сегодняшний день многие работы базируются на исследованиях нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), непосредственно извлеченных из образцов различных почв [3, 4]. При помощи полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с соответствующими филогенетическими маркерами (*16S rRNA*, *18S rRNA* и др.) проводится изучение, определение генов, кодирующих малую или большую субъединицу рибосомальной РНК (*rRNA*), что способствует дальнейшему развитию исследований разнообразных изолятов и некультивируемых видов микробных сообществ биогеоценозов [5, 6]. Следует отметить, что сравнительный анализ природных микробных сообществ способствует ускоренному изучению их структурно-функциональных особенностей, учитывая специфичность уникальных или доминирующих групп при определенных условиях [7, 8].

Методика. Изучение почвенных микробных сообществ осуществлялось на базе сверхдлительного (с 1912 г.) стационарного полевого опыта Российского государственного аграрного университета Московской сельскохозяйственной академии им. К. А. Тимирязева (МСХА). Опытное поле находится в центральной части Русской равнины, на окраине склона Клинско-Дмитровской гряды. Рельеф близлежащей территории представляет моренную равнину на водоразделе рек Москва и Яуза и возвышается над уровнем реки Москва на 60 м. Опытный участок размером 1,53 га с ровной макроповерхностью и небольшим уклоном (1 град) на северо-запад. Почвообразующие породы представлены четвертичными отложениями супесчаной и суглинистой бурой морены с прослойками (10–22) юрских глин. Международное название почвообразующей породы — суглинистая красно-бурая плейстоценовая морена.

Почва дерново-слабоподзолистая, старопашотная кислая и заплывающая (по классификации ФАО — Podsoluvisol). Согласно данным гранулометрического анализа, в пахотном (0–20 см) слое почвы содержалось фракций менее 0,01 мм 22,0% [9].

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

- Бессменная культура: 1 — лен (контроль); 2 — лен + НРК; 3 — лен + навоз;
- Севооборот: 4 — лен + НРК; 5 — чистый пар.

Экстракцию ДНК почвенных микроорганизмов осуществляли методом, описанным в [10]. Проводили визуальную детекцию полученных образцов ДНК после электрофоретического разделения в 1% агарозном геле (рис. 1), после чего полученную почвенную ДНК очищали от примесей гуминовых кислот как описано в [11].

Выполняли ПЦР флуоресцентно-мечеными праймерами (рис. 2) *Eu3* [12], затем 1 мкл полученного продукта ПЦР рестрицировали ферментами *HaeIII* и *MspI* (обязательными и незаменимыми инструментами практически всех этапов этого сложного процесса).

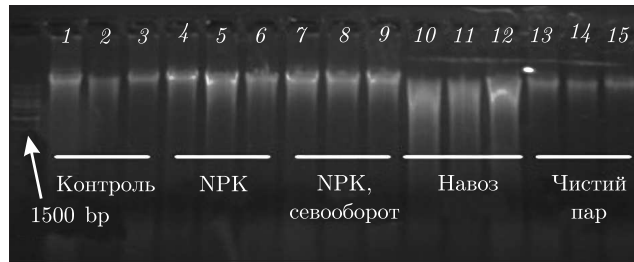


Рис. 1. Электрофореграмма тотальной почвенной ДНК:
1 — маркер молекулярных масс (1500 bp); 2–15 — повторности вариантов отбора

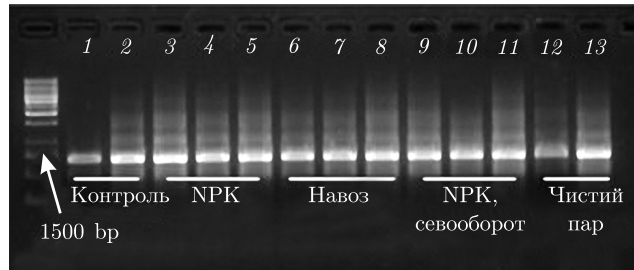


Рис. 2. Электрофореграмма 16S rRNA с флуоресцентно-меченным праймером:
1 — маркер молекулярных масс (1500 bp); 2–13 — повторности вариантов отбора

В автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 8000 определяли интенсивность флуоресценции каждого пика, который пропорционален количеству геномного соответствия ДНК для каждой таксономической единицы в образце. Для классификации биотического сообщества на примере полученных результатов использовались показатели доминирования и сходства между двумя пробами [13, 14].

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ профилей *tRFLP* (рис. 3) показал значительную разницу между ними. Это отображается как в количестве обнаруженных генотипов, так и в структуре их распределения.

По индексу “видового” богатства прокариот почвы различных вариантов опыта располагаются в убывающем порядке следующим образом: лен в севообороте в варианте с применением NPK → бессменная культура льна, навоз → бессменный лен → бессменный лен по фону NPK → чистый пар. Таким образом, видовое богатство прокариот выше в почвах, куда систематически поступали вещества в виде растительных остатков и органических удобрений, что согласуется с имеющимися в литературе данными.

Более подробный анализ экологических параметров комплекса прокариот (табл. 1) показал, что генотипическое разнообразие, определяемое по индексу Шеннона, наиболее высокое в почве, где лен выращивали в севообороте (4,01), наименьшее в бессменной культуре льна (2,37–2,90) и чистом паре (2,66). Промежуточное положение занимает бессменный лен, выращиваемый по фону систематического применения навоза (3,68).

Индекс доминирования является относительно низким, что говорит о достаточно стабильных гомеостатических системах, сложившихся на протяжении 95 лет. Однако уровень доминирования в севооборотном варианте и бессменной культуре с навозом был в 2–3 раза ниже, чем в других вариантах опыта, что характеризует более высокую выравненность численности различных генотипов прокариот в комплексе.

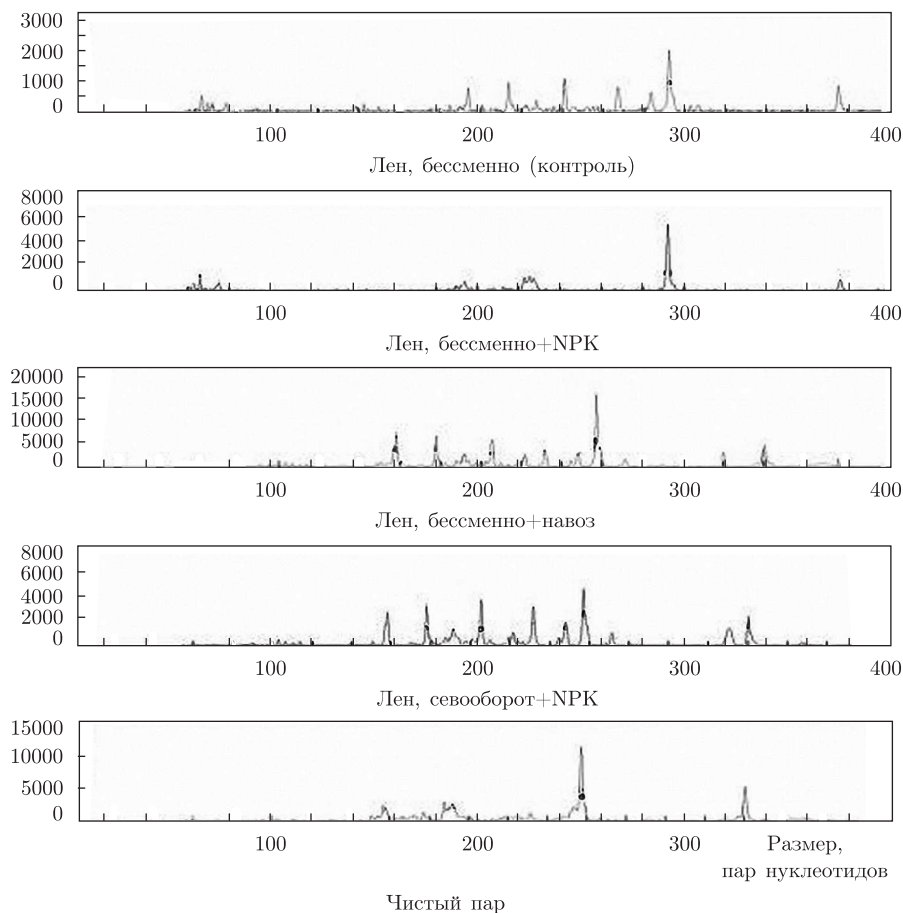


Рис. 3. Влияние сверхдлительной (с 1912 г.) культуры *Linum usitatissimum* L. на генетическое разнообразие прокариот в подзолистой почве (профиль *tRFLP*, праймер *EU3*, на оси абсцисс указан диапазон размера 60–400 пар нуклеотидов, на оси ординат — интенсивность флуоресценции)

Анализируя сходство генотипических структур комплекса прокариот в различных вариантах опыта, следует отметить весьма существенную разницу между ними. В частности, индекс “видового” сходства прокариот почвы под посевами льна в севообороте и бессменной культуре является низким и составляет 0,074, а в бессменной культуре с применением

Таблица 1. Экологические параметры прокариотного комплекса подзолистой почвы в сверхдлительном опыте МСХА

Вариант	Показатель		
	разнообразия, <i>H</i>	доминирования, <i>C</i>	сходства*
Бессменная культура льна			
без удобрений	2,37	0,21	0,074
NPK	2,90	0,23	0,059
навоз	3,68	0,12	0,667
Севооборот			
чистый пар	2,66	0,217	0,466
лен + NPK	4,01	0,063	1,000

* Коэффициент попарного сходства рассчитан по формуле [14] и выражен в относительных величинах по отношению к севообороту.

НРК — всего 0,059, в то время как в бессменной культуре с навозом он возрастает до 0,667 и приближается к севооборотному варианту. Полученные данные указывают на то, что в условиях различных систем земледелия и агрофитоценозов формируются разные по генотипической структуре комплексы микроорганизмов. Эти различия возрастают по годам.

В бессменной культуре льна корневые экссудаты, листовая и корневая опад дают незначительное поступление органического вещества в почву. Вследствие этого, по-видимому, снижаются энергетические запасы, происходит истощение легкоподвижного органического вещества, что ограничивает возможности для развития микроорганизмов. Микрофлора почвы находится в экстремальных условиях. В еще худших условиях находится почва чистого пара. Здесь фактически исключено поступление в почву органического вещества. По индексу разнообразия и доминирования эти почвы близки. Однако мы не имеем ни одного сходного генотипа для этих вариантов опыта. Следовательно, дело не только в дефиците органического вещества. По-видимому, лен оказывает специфическое действие на микрофлору, обуславливающее накопление в почве микроорганизмов продуцентов фитотоксических и антибиотических веществ [14], которые ингибируют рост растений и оказывают селекционное действие на бактерии. Однако этот вопрос требует дополнительного изучения.

Согласно результатам исследования, на формирование структуры микробного комплекса почвы под посевами льна-долгунца существенное влияние оказывает история поля (севооборот, бессменная культура). В условиях длительной бессменной культуры льна-долгунца по сравнению с севооборотом происходит обеднение бактериального комплекса и изменение его структуры. Наблюдается смена доминирующих форм. Снижается генетическое разнообразие прокариот. Длительное применение минеральных удобрений в бессменной культуре оказывает отрицательное действие на генетическое разнообразие микроорганизмов почвы. Ряд видов выпадает из микробоценоза. Это свидетельствует о том, что монокультура растения льна способствует обеднению генетических ресурсов микрофлоры почв и коренному изменению ее качественного состава, что, по-видимому, напрямую связано со снижением устойчивости растений к природным и антропогенным стрессам.

Таким образом, использование метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (*tRFLP*) позволяет сравнить структуру микробных сообществ, а также продемонстрировать и оценить бактериальное разнообразие в почвах, увидеть новые генотипы почвенной микробиоты, не культивируемые или слабокультивируемые на селективных средах общепринятыми микробиологическими методами, что открывает широкие перспективы применения его для изучения экологии микробных сообществ и микробиологического мониторинга почв.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГНУ ВНИИСХМ Е. Е. Андронову, А. Г. Пиняеву, сотрудникам кафедры земледелия РГАУ МСХА за содействие в проведении научно-исследовательских работ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 07-04-13 527 офи-ц.

1. Buckley D. H., Schmidt T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation // Microbial Ecol. – 2001. – **42**. – P. 11–21.
2. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L. High diversity in DNA of soil bacteria // Appl. and Environ. Microbiol. – 1990. – **56**. – P. 782–787.
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Ed. D. R. Boone, R. W. Castenholz. – 2nd. ed. – New York; Berlin; Heidelberg; Springer, 2001. – Vol. 1. – 721 p.
4. Felske A., Wolterink A., Van Lis R. et al. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes // Appl. and Environ. Microbiol. – 2000. – **66**. – P. 3998–4003.

5. *Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R.* Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // *Ibid.* – 1998. – No 1. – P. 173–198.
6. *Marsh T. L.* Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – **2**. – P. 323–327.
7. *Widmer F., Fliessbach A., Laczko E. et al.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM-analyses // *Soil Biol. and Biochem.* – 2001. – **33**. – P. 1029–1036.
8. *Длительному полевому опыту ТСХА 90 лет: итоги научных исследований /* Под ред. А. Ф. Сафонова. – Москва: Изд-во МСХА, 2002. – 246 с.
9. *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. – **9**. – P. 1–55.
10. *Duarte G. F., Rosado A. S., Seldin L. et al.* Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community // *J. Microbiol. Methods.* – 1998. – **32**. – P. 21–29.
11. *Doyle J. J., Doyle J. L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* – 1987. – **12**. – P. 13–15.
12. *Moreira D.* Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // *Nucl. Acids Res.* – 1998. – **26**, No 13. – P. 3309–3310.
13. *Brajesh K. S., Nazaries L., Munro S. et al.* Use of Multiplex Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid and Simultaneous Analysis of Different Components of the Soil Microbial Community // *App. and Environ. Microbiol.* – 2006. – **72**, No 11. – P. 7278–7285.
14. *Одум Ю.* Основы экологии / Под ред. Н. П. Наумова. – Москва: Мир, 1975. – 733 с.

Государственное научное учреждение
 Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
 микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин
 Институт микробиологии и вирусологии
 им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 16.04.2008

N. V. Patyka, Y. V. Kruglov, I. A. Tihonovich, V. F. Patyka

The length polymorphism profile of restrictive fragments (*tRFLP*) of a complex of procaryotic microorganisms in podsolic soils

*Using a method of polymorphism of the lengths of restriction fragments (*tRFLP*), the comparative analysis of a complex of procaryotic microorganisms of podsolic soils is carried out on the long-term cultivation of flax, taking the index of genetic variety into account.*