ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОВ 16S рРНК ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология
очной формы обучения, группы 11001945
Нечаевой Анастасии Игоревны

Научный руководитель:
д.б.н., заведующая кафедрой
биотехнологии и микробиологии
Батлуцкая И.В.

Рецензент:
к.б.н., доцент, декан факультета
математики и естественнонаучного
образования педагогического
института НИУ «БелГУ»,
Чернявских С.Д.

БЕЛГОРОД 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……. 3
ГЛАВА 1. Литературный обзор…… 6
1.1. Почва как экосистема……..... 6
1.2. Микробиота почв……...…. 12
1.3. Влияние микроорганизмов на урожайность сельхозкультур……...…. 21
1.4. Ключевые группы хозяйственно-ценных почвенных микроорганизмов…….…… 30
1.5. Особенности гена 16s рРНК у почвенных микроорганизмов…. 36
ГЛАВА 2. Материалы и методы……..... 42
2.1. Микробиологические методы……... 42
2.2. Выделение геномных ДНК……. 45
2.3. ПЦР-амплификация гена 16S рРНК…….. 48
2.4. Выделение ампликонов из агарозного геля……..…... 50
2.5. Секвенирование генов 16S рРНК и обработка его результатов……...……...…. 53
2.6. Биоинформатический анализ изменчивости последовательностей 16S рРНК……..... 55
ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение…….. 58
3.1. Выделение чистых культур почвенных бактерий……...… 58
3.2. Получение препаратов ампликонов 16S рРНК и их секвенирование……..…. 59
3.3. Биоинформатический анализ изменчивости последовательностей 16S рРНК…… 60
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….. 63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ……...…... 65
ПРИЛОЖЕНИЯ…….. 72

ВВЕДЕНИЕ

Проблема рационального использования почв и сохранение их плодородия затрагивает интересы каждого человека, как в самой его деятельности, так и в глобальном масштабе, особенно - в сельском хозяйстве. Особо острой проблемой является переуплотнение почвы, из-за которого страдает её урожайность и плодородие. На сегодняшний день в России переуплотнению подвергнуто более 80% земель, предназначенных для выполнения сельскохозяйственных работ, соответственно теряется более 30-35% урожая (Минеев В.Г. и др., 2017).

Само понятие "плодородие почвы" крепко связано с её способностью к высокой урожайности с качественным полученным продуктом. В узком смысле определяется как способность обеспечивать урожай достаточным количеством питательных веществ для оптимального развития сельскохозяйственных культур в течение вегетационного периода.

Причины потери плодородия почв тесно связаны с ветровой, водной и биологической эрозиями. Последняя подразумевает под собой потерю органических веществ из-за их минерализации и деструкции. При этом, данные причины самостоятельно не проявляются, так как зависят от розы ветров, рельефа местности и типа осадков в местах обработки почвы.

В настоящее время в большинстве почв осталась лишь консервативная часть гумуса, которая совсем не поддается минерализации и чтобы поддерживать его активность требуется периодически вносить удобрения и различные элементы для питания, образующиеся при распаде растительных остатков.

Например, если из-за неправильного регулирования почвы корневая система культуры не развивается должным образом, культура может не иметь доступа к достаточному количеству питательных веществ для оптимального развития, тогда как при другой системе регулирования культура будет развиваться оптимально. Точно так же неправильное регулирование почвой

может препятствовать проникновению дождевой воды в начале сезона дождей. На равнине это может способствовать развитию временных восстановительных условий в почве. Это может привести к потере из-за денитрификации азота, который, в противном случае, был бы доступен для сельскохозяйственных культур.

Другой пример - внесение в почву органических материалов. При применении в неподходящее время или в неблагоприятных условиях это может привести к чистой иммобилизации минерального азота в то время, когда он нужен культуре, тогда как чистая минерализация азота может произойти после вегетационного периода, что приведет к потере азота из почвы путем денитрификации или выщелачивания.

Почвенные бактериологи показали, что определенные виды бактерий, живущие в почвах, обладают способностью потреблять неисчерпаемый запас азота в воздухе (который содержит 79% азота) и закреплять в почве в доступном для растений виде (Трепачев Е.П., 1999).

В настоящее время полностью не изучена микробиота почв, так как она изменяется как от климата, так и от сезона. Соответственно важно сохранять хозяйственно-ценные почвенные микроорганизмы либо вносить их с помощью биоудобрений. В связи с этим необходимо знать какие виды бактерий, а именно, хозяйственно-ценные бактерии, способны сохранять свою жизнедеятельность в почве и стимулировать рост культур в сельском хозяйстве.

Проследить изменчивость хозяйственно-ценных почвенных бактерий можно с помощью современных методов: ПЦР-амплификации, секвенирования и биоинформатического анализа изменчивости последовательностей. Их использование позволяет увидеть полную картину разнообразия почвенных микробных сообществ, а особенно тех, кто не поддается культивированию.

Целью исследования был анализ внутривидовой изменчивости гена 16S рРНК хозяйственно-ценных почвенных бактерий, выделенных на среде Виноградского.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) Выделить два наиболее многочисленных вида почвенных бактерий, способных к росту на среде Виноградского;

2) Определить видовую принадлежность выделенных штаммов по нуклеотидным последовательностям ампликонов 16S рРНК;

3) Оценить внутривидовую изменчивость участков 16S рРНК, получаемых в виде ампликонов в рамках применяемого метода;

4) Установить, какие из традиционно выделяемых вариабельных и консервативных участков 16S рРНК секвенируются применёнными нами праймерами 27F и 1525R.

ГЛАВА 1. Литературный обзор

1.1. Почва как экосистема

Почва представляет собой сложную динамическую систему, состоящую из биотических и абиотических компонентов и представляющую собой основную среду обитания и гавань биологической активности и разнообразия, поддерживающую несколько экосистемных услуг. Формирование почвы зависит от нескольких факторов, таких как материнский материал, топография, климат, биота и время. Эти факторы будут влиять на почвообразование, а также на характеристики почвы, влияя на все ее функции, услуги и способность к плодородию.

Почва часто подвергается нескольким угрозам со стороны прямых или косвенных антропогенных источников. Практика ведения сельского и лесного хозяйства, урбанизация (например, удаление отходов), горнодобывающая и промышленная деятельность являются одними из основных причин неправильного использования почвы и чрезмерной эксплуатации. Когда загрязнение почвы влияет на биоту, все функции и услуги почвы потенциально могут быть изменены; поэтому загрязнение почвы - это проблема, которую необходимо учитывать в процедурах оценки риска. Кроме того, изменение климата оказывает давление на почвенные экосистемы, изменяя физический, химический и структурный состав почвы.

Здоровье почвы определяется как «способность почвы функционировать как жизненно важная живая система для поддержания биологической продуктивности, поддержания качества окружающей среды и укрепления здоровья растений, животных и человека» (Doran J.W. *et al*., 1996; Doran J.W. *et al*., 2000). Здоровье почвы напрямую связано с качеством почвы. Хотя оба термина часто использовались взаимозаменяемо, качество почвы относится к способности системы выполнять определенные функции, тогда как здоровье почвы относится к ее общему состоянию. Здоровье почвы

зависит главным образом от поддержания четырех основных функций, которые, в свою очередь, определяются комбинацией различных биологических процессов: преобразование углерода, круговорот питательных веществ, поддержание структуры почвы и биологическое регулирование популяции (Kibblewhite M.G. *et al*., 2008). Биологические процессы, обеспечивающие эти функции, обеспечиваются набором ключевых функциональных групп почвенных живых организмов.

Качество (здоровье) почвы определяется сочетанием множества физических, химических и биологических свойств. Некоторые из этих свойств могут использоваться в качестве инструментов/индикаторов мониторинга для оценки изменений конкретных функций почвы и, следовательно, общего качества/здоровья почвенной экосистемы в результате различных методов управления, естественных нарушений (например, изменений климата) и загрязнения (Doran J.W. *et al*., 2000; Schloter M. *et al*., 2003; Gil-Sotres F. *et al*., 2005; Marinari S. *et al*., 2006).

Сообщество организмов, живущих в почве, играет важную роль в успешном функционировании сельскохозяйственных экосистем. Это сообщество состоит из бактерий, грибов, простейших, нематод (хищников микроорганизмов и патогенов растений), дождевых червей, членистоногих и других организмов. Хотя некоторые виды вредны для сельскохозяйственных культур, большинство из них полезны и даже необходимы для благополучия растений. Существует поразительное сходство между ролями микроорганизмов в организме человека и в почве. Несмотря на значительное внимание, уделяемое почвенным вредителям, количество полезных видов в почве намного превышает количество вредных.

Важность почвенных организмов часто игнорируется и может маскироваться и уменьшаться в системах возделывания почвы, которые полагаются на синтетические удобрения, высокие уровни пестицидов и минимальное поступление углерода. С другой стороны, системы земледелия, которые включают в себя органические добавки в качестве источников

питательных веществ, особенно зависят от биологической активности при разложении этих добавок.

Использование человеком почвы для производства продуктов питания началось через две или три тысячи лет после окончания последнего ледникового периода плейстоцена, который наступил примерно через 11 тысяч лет назад (до настоящего времени). Люди эпохи неолита и их примитивное земледелие распространились за пределы поселений в плодородном полумесяце, охватывающем древние земли Месопотамии, Ханаана и южной Турции, а за несколько тысяч лет достигли Китая и Америки (Crawford J.W. *et al*., 2005). В Китае, например, самые ранние записи исследования почвы (4000 лет назад) показывают, как плодородие почвы использовалось в качестве основы для взимания налогов с землевладельцев (Barrios E., 2007). Изучение почвы было практическим упражнением повседневной жизни, и знания о земледелии, приобретенные во времена Римской империи, передавались крестьянами и помещиками с небольшими нововведениями до начала 18 века (Crawford J.W. *et al*., 2005; Alexander M., 1977).

Однако с этого времени спрос на сельскохозяйственную продукцию в Европе резко вырос. Условия относительного мира и повышение уровня жизни в результате промышленной революции еще больше стимулировали этот спрос на протяжении XIX века (Alexander M., 1977). Этот период был также одним из великих открытий в физике и химии, последствия которых иногда оказывали сокрушительное воздействие на консервативный мир сельского хозяйства (Alexander M., 1977). В 1840 году фон Либих установил, что растения поглощают питательные вещества в виде неорганических соединений из почвы, хотя он настаивал на том, что растения получают свой азот (N) из атмосферы (Marinari S. *et al*., 2006): Лоус и Гилберт в Ротамстеде впоследствии продемонстрировали, что растения (кроме бобовых) поглощают неорганический азот из атмосферы. почва. В 1850-х годах Уэй открыл процесс катионного обмена в почве (Crawford J.W. *et al*., 2005). В период с 1860 по 1890

годы выдающиеся бактериологи, включая Пастера, Уорингтона и Виноградского, выяснили роль микроорганизмов в разложении растительных остатков и превращении аммиака в нитрат (Barrios E., 2007; Alexander M., 1977).

За тот же период ботаники, такие как фон Сакс и Кноп, путем тщательных экспериментов с водным культивированием и анализа растительной золы определили основные элементы, которые необходимы для здорового роста растений. Агрохимики составили балансы количеств этих элементов, поглощаемых культурами, и, соответственно, количества, которые должны быть возвращены в почву в виде удобрений или навоза для поддержания роста (Crawford J.W. *et al.*, 2005; Barrios E., 2007). Этот подход, при котором почва считалась относительно инертной средой, обеспечивающей воду, минеральные ионы и физическую поддержку растений, получил название концепции «бункера питательных веществ».

Почва четко отличается от инертного горного материала (Минеев В.Г. и др., 2017; Gil-Sotres F. *et al.*, 2005):

- наличием растительного и животного мира;
- структурной организацией, отражающей действие почвообразующих процессов;
- способностью реагировать на изменение окружающей среды, которое может изменить баланс между прибылями и убытками в профиле и предопределить формирование другой почвы в равновесии с новым набором условий окружающей среды.

Последний пункт указывает на то, что почва не имеет фиксированной наследственности, поскольку зависит от условий, преобладающих при ее формировании. Также невозможно однозначно определить границы почвенного тела. Почвенная атмосфера сплошная с воздухом над землей, многие почвенные организмы живут как на поверхности, так и внутри почвы, слой подстилки обычно постепенно сливается с разложившимся органическим веществом в почве, и точно так же затруднена граница между почвой и

материнским материалом (Gil-Sotres F. *et al*., 2005; Crawford J.W. *et al*., 2005; Barrios E., 2007). Поэтому почве является трехмерным телом, которое непрерывно изменяется во времени и пространстве.

Следуя примеру России, ученые из других стран начали понимать, что такие факторы, как климат, материнский материал, растительность, топография и время, взаимодействуют разными способами, создавая почти бесконечное разнообразие типов почв (Минеев В.Г. и др., 2017; Альферманн А.В. и др., 1987). Для любого конкретного сочетания этих почвообразующих факторов была установлена уникальная физико-химическая и биологическая среда, которая привела к развитию своеобразного почвенного тела - процессу почвообразования.

Многие почвы имеют полигенетическое происхождение; то есть они претерпели последовательные фазы развития из-за изменений климата и других факторов окружающей среды с течением времени. В других случаях в одном профиле почвы обнаруживаются два или более слоя разного исходного материала. Тем не менее, российский подход был значительным шагом вперед по сравнению с традиционным мышлением, и признание взаимосвязи между почвой и окружающей средой побудило почвоведов к исследованию и составлению карт распределения почв. Выявленный широкий диапазон морфологии почв, в свою очередь, стимулировал изучение почвообразования, понимание которого, как полагали, позволило бы более систематически сопоставить обширные полевые данные о почвах (Альферманн А.В. и др., 1987; Мишустин Е.Н. и др., 1968; Никляев В.С. и др., 2000). Таким образом, российское почвоведение послужило источником вдохновения для многих ранних классификаций почв.

В период между двумя мировыми войнами 20-го века философия почвы как «хранилища питательных веществ» была преобладающей, особенно в западном мире. Все больше и больше земель использовалось для возделывания, большая часть которых была маргинальной для растениеводства из-за ограничений климата, почвы и топографии. Когда

баланс между успешным урожаем и неурожаем стал еще более ненадежным, чем в благоприятных районах, извечные проблемы ветровой и водной эрозии, заселения сорняками и накопления солей на орошаемых землях стали более серьезными (Мишустин Е.Н. и др., 1968). С 1945 года спрос на продукты питания, волокна и лесные продукты со стороны растущего населения мира (сейчас более 7 миллиардов) привел к увеличению использования удобрений для повышения урожайности и пестицидов для борьбы с вредителями и болезнями (Никляев В.С. и др., 2000). Такая практика привела к некоторому накоплению нежелательных остатков пестицидов в почве и к увеличению потерь растворимых компонентов, таких как нитраты и фосфаты, в поверхностные и грунтовые воды. Также широко распространено распространение очень стабильных пестицидов (например, хлорорганических соединений) в биосфере и их накопление до концентраций, потенциально токсичных для некоторых видов птиц и рыб.

Однако совсем недавно ученые, производители и специалисты по планированию признали необходимость компромисса между максимальным увеличением производства сельскохозяйственных культур и сохранением ценных природных ресурсов. Теперь упор делается на поддержание естественного состояния почвы за счет сведения к минимуму нарушений при выращивании сельскохозяйственных культур, более точного согласования добавок удобрений с потребностями сельскохозяйственных культур для сокращения потерь, использования бобовых для фиксации азота из воздуха и возврата растительных остатков и отходов в почву для удовлетворения некоторых потребностей сельскохозяйственных культур в питательных веществах.

1.2. Микробиота почв

Несмотря на то, что почвенные микроорганизмы невидимы невооруженным глазом, они являются важной частью подземного сообщества сельскохозяйственных почв и потенциально ценным активом для фермеров. Их ценность заключается в той роли, которую они играют в разложении органических веществ, улучшении структуры почвы, круговороте питательных веществ и в качестве живого резервуара питательных веществ. Микробное сообщество наиболее полезно для производителя, когда оно разнообразное, многочисленное и активное. Популяции микробов играют активную и пассивную роль в плодородии почвы.

Основными группами почвенных микроорганизмов являются бактерии (включая актиномицеты), грибы и простейшие (рис. 1). Поскольку эти микроорганизмы лучше всего характеризуются ролями, которые они играют, а не отдельными видами, их часто разделяют на функциональные группы. Одним из важных примеров являются бактерии и грибки, ответственные за преобразование органических соединений в их минеральные компоненты, процесс, называемый минерализацией (Никляев В.С., 2000). Минерализаторы включают микробы, которые расщепляют сложные и крупные молекулы растений (например, целлюлозу, гемицеллюлозу, лигнин) на более мелкие молекулы, а также микробы, которые превращают более мелкие молекулы (например, сахара, аминокислоты, ароматические соединения, алифатические соединения) в более простые минеральные формы (например, аммоний- и нитрат-азот, диоксид углерода, вода, сульфат) (Singer M. J., and Munns D. N., 1991).

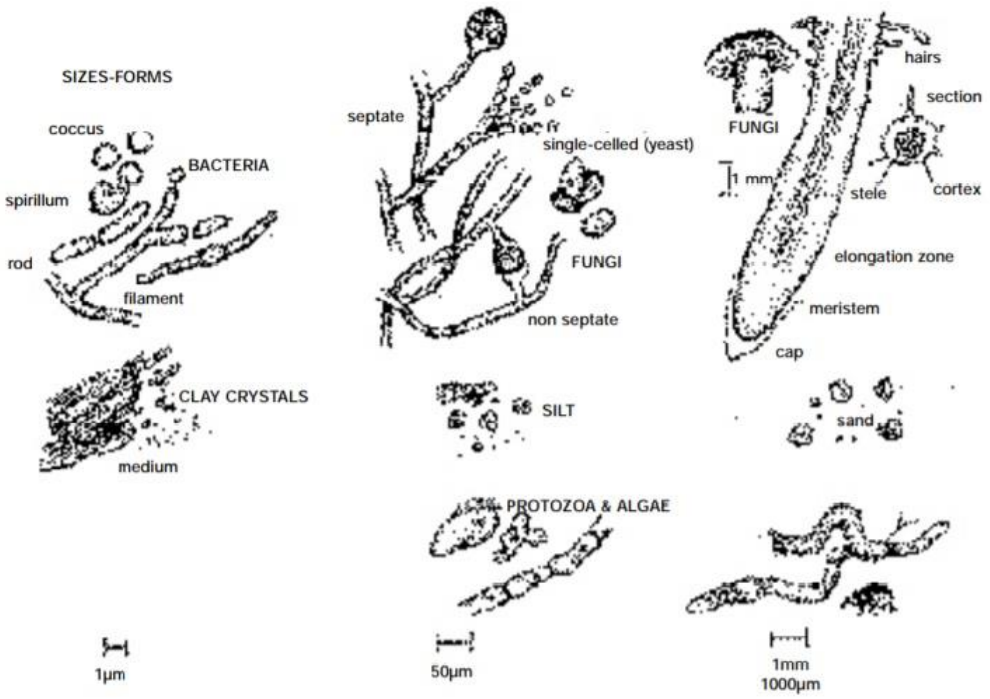

Рис. 1. Размеры и формы почвенной биоты в зависимости от размеров частиц.

Источник: Singer M. J., and Munns D. N., 1991, с. 145

Многие другие важные с точки зрения сельского хозяйства функции выполняются почвенными микроорганизмами. Прекрасные обзоры почвенных организмов и их функций представлены в работах Киллхэма (1994) (Killham K., 1994) и Пола и Кларка (1989) (Paul E.A. and Clark F.E., 1989). Важные группы включают нитрифицирующие бактерии (*Nitrosolobus*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*), которые участвуют в превращении аммония в нитрат (Brown, P. E., 1913). Это преобразование делает азот не только более доступным для некоторых растений, но и напрямую подверженным выщелачиванию и денитрификации.

Другая группа организмов наиболее активна в плохо аэрируемых условиях (Lavelle P., Spain A.V., 2001), например, когда почвы затоплены или плохо осушены, или когда потребность в кислороде превышает то, что может быть доставлено путем диффузии через поры, заполненные воздухом.

Денитрифицирующие бактерии превращают нитраты в формы азота, которые теряются в атмосферу в виде газообразного азота или закиси азота (Brown, P. E., 1913; Lavelle P., Spain A.V., 2001). Ферментеры, такие как

дрожжи и некоторые бактерии, разлагают органические материалы в анаэробных условиях, часто образуя дурно пахнущие вещества (Singer M. J. and Munns D. N., 1991; Paul E.A. and Clark F.E., 1989).

Существуют группы бактерий, которые окисляют (часто при наличии кислорода) или восстанавливают (обычно при отсутствии кислорода) многие элементы, являющиеся питательными веществами для растений. Эти микробные реакции могут привести, в зависимости от элемента, к превращению железа, серы, марганца и некоторых микроэлементов в формы, более или менее доступные для сельскохозяйственных культур (Killham K., 1994; Paul E.A. and Clark F.E., 1989).

Другие группы организмов, такие как микоризные грибы, делают фосфор более доступным для растений, либо растворяя сложные фосфорсодержащие вещества, либо эффективно увеличивая площадь поверхности корней растений (Killham K., 1994; Paul E.A. and Clark F.E., 1989).

Азотфиксирующие бактерии, такие как симбионты из рода *Rhizobium* и свободноживущие *Azotobacter* и *Azospirillum*, превращают газообразный элементарный азот (N_2) в атмосфере в аммиак (NH_3), который может быть легко использован растениями (Paul E.A. and Clark F.E., 1989). Ризобии, живущие в симбиозе с бобовыми, обеспечивают азот для роста этих культур, уменьшая или устраняя потребность в азотных удобрениях. Если покровная культура внесена в почву в качестве сидерата, большая часть азота, зафиксированная симбиотическими отношениями, может удобрять последующие культуры. Из-за большого количества энергии, необходимого для фиксации азота, количество азота, фиксируемого свободноживущими бактериями, значительно ниже, чем количество азота, фиксируемого симбиотическими бактериями (Paul E.A. and Clark F.E., 1989). Это связано с тем, что свободноживущие организмы должны конкурировать со многими другими почвенными микроорганизмами за органические соединения, обеспечивающие энергию, тогда как симбиотические организмы получают соединения непосредственно из растений.

Другие функции почвенных микроорганизмов влияют на физические свойства почвы (Giller P.S., 1996). Превращение ими растительного материала в более стабильные формы органических соединений, составляющих гумус, важно для сохранения органической фракции почвы. Многие организмы способствуют формированию и стабильности агрегатов почвы за счет производства внеклеточных полисахаридов (например, бактерий и грибов) и физического связывания органических веществ и глины с гифами (например, грибами и актиномицетами) (Lavelle P., Spain A.V., 2001; Giller P.S., 1996). Еще одна важная функция - способность определенных микроорганизмов разлагать органические пестициды на безвредные продукты (Morgado, R. G. *et al*., 2018). Если бы микроорганизмы не разлагали эти вещества, концентрация пестицидов в сельскохозяйственных почвах в конечном итоге достигла бы опасного уровня.

Одна группа микроорганизмов, заслуживающая особого внимания из-за их важности для виноградников, - это микоризные грибы (Morgado, R. G. *et al*., 2018; Scow, K. M. *et al*., 1994; Zarraonaindia I. *et al*., 2015). Микоризные грибы образуют полезные симбиотические отношения с корнями растений. Микоризы встречаются почти на всех типах растений; единственное исключение - это капуста, такая как горчица и редис (Bethlenfalvay, G. J., and Lindermann R. G., 1992). Особый тип микоризы, образующейся на винограде и небрассовых покровных культурах, называется пузырно-мышечной микоризой (Lindermann, R. G., 1988). Грибы пузырно-мышечной микоризы проникают в клетки корней растений и вырастают гифы, которые распространяются в окружающую почву. Гифы - это длинные тонкие нити, образующие основную массу грибов. Гифы пузырно-мышечной микоризы эффективно увеличивают площадь поверхности корневой системы растений и помогают растению добывать питательные вещества из областей, недоступных корням растений, или получать питательные вещества, которые очень медленно диффундируют через почвенный раствор (например, фосфор). Взамен грибы пузырно-мышечной микоризы получают углеводы,

произведенные растением в процессе фотосинтеза. Растение получает выгоду от улучшенного усвоения питательных веществ, а также потому, что корни, заселенные пузырно-мышечной микоризой, часто более устойчивы к атакам грибковых патогенов и паразитических нематод (Perrin, R., 1990; Hussey, R. S., and Roncadori R. W., 1982). Отдельные экземпляры растений и виды могут быть фактически связаны под землей мостом из гиф пузырно-мышечной микоризы, при этом фосфор передается от одного растения к другому через эту подземную сеть (Chiariello, N. *et al*., 1982).

Круговорот питательных веществ и поток энергии в почвенных экосистемах связаны с разложением органических веществ. Органическое вещество почвы состоит из широких групп веществ, часто называемых бассейнами, которые различаются по скорости разложения и функциям (Decaens T., 2010). С одной стороны, органическое вещество включает легко разлагаемые материалы, которые еще не были преобразованы или все еще очень похожи на свое растительное и животное происхождение. С другой стороны, органическое вещество состоит из гуминовых веществ, которые практически не поддаются дальнейшему разложению. Одним из важнейших резервуаров органического вещества является микробная биомасса (масса микроорганизмов). Микробная биомасса является относительно доступным резервуаром питательных веществ для растений, таких как азот и фосфор (Marumoto T. *et al*., 1982). Хотя размер микробной биомассы относительно невелик (например, содержание в ней азота составляет от 1 до 5 процентов от общего органического азота в почве), питательные вещества в этом резервуаре быстро рециркулируются в пределах профиля почвы, возможно, от 8 до 10 раз на год (Coleman, D. C. *et al*., 1983). Количество азота в микробной биомассе сельскохозяйственных почв колеблется от 36 до 344 фунтов на акр (от 40 до 385 кг/га) (Paul, E. A., and Voroney R. P., 1984).

Почвенные организмы можно разделить по размеру на:

- макрофауну - позвоночные животные преимущественно роющего типа, такие как кроты и кролики, которые живут полностью или частично под землей;
- мезофауну - мелкие беспозвоночные животные, представляющие филы *Arthropoda, Annelida, Nematoda* и *Mollusca*;
- микроорганизмы - включая микрофауну (почвенные животные <0,2 мм в длину) и микрофлору (бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и вирусы).

Почвы содержат пять основных групп микроорганизмов. Это бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и простейшие. Среди почвенных микроорганизмов бактерии являются наиболее доминирующей группой организмов. В почве обитают всевозможные бактерии. Это потому, что все виды органических отходов выбрасываются в почву. Многие почвенные бактерии выполняют полезные функции, такие как разложение органических веществ, преобразование компонентов почвы в полезные материалы, производство антибиотиков в почве и биогеохимический цикл таких элементов, как углерод, азот, фосфор, железо, сера и марганец (Baldock J. A. and Nelson P. N., 2000).

По своему эволюционному развитию микроорганизмы можно разделить на:

- прокариоты (организмы без настоящего ядра), к которым относятся бактерии, актиномицеты и *Cyanophyceae*;
- эукариоты (организмы с мембраносвязанным ядром), к которым относятся грибы, водоросли и простейшие.

Почвенные организмы можно также классифицировать по способу питания. В широком смысле гетеротрофы, к которым относятся многие виды бактерий и все грибы, нуждаются в С в форме органических молекул для роста. Однако автотрофы, к которым относятся оставшиеся бактерии и большинство водорослей, синтезируют свое клеточное вещество из углерода CO_2, используя энергию солнечного света (в случае фотосинтезирующих

бактерий и водорослей) или химическую энергию от окисления неорганических соединений (хемоавтотрофы) (Edwards C. A., 1991). Другой способ деления микроорганизмов основан на их потребности в молекулярном O_2:

- аэробы - те, кому требуется O_2 в качестве конечного акцептора электронов при дыхании;
- факультативные анаэробы - те, которые обычно нуждаются в O_2, но способны адаптироваться к бескислородным условиям, используя NO_3^- и другие неорганические соединения в качестве акцепторов электронов при дыхании;
- облигатные анаэробы - те, которые растут только в отсутствие O_2, потому что O_2 токсичен для них.

Эти организмы могут достигать 1 мкм в длину и 0,2 мкм в ширину и поэтому живут в водных пленках вокруг частиц почвы во всех порах, кроме мельчайших. Они могут быть подвижными или неподвижными, кокковидными (круглыми) или палочковидными и могут очень быстро размножаться в почве при благоприятных условиях - всего за 8–24 ч для образования двух дочерних организмов с помощью деления единственной родительской клетки (Paul, E. A., and Voroney R. P., 1984; Baldock J. A. and Nelson P. N., 2000). Соответственно, их количество в почве огромно при подходящих условиях жизни, особенно при наличии пищи. Число бактерий оценивается путем наблюдения за ростом колоний на специальной питательной среде, засеянной каплями очень разбавленной почвенной суспензии (метод чашки разбавления). Если бактерии не могут быть культивированы, регистрируется самое высокое разведение, в котором сохраняются жизнеспособные организмы, и используется для обратного расчета первоначального размера популяции (метод наиболее вероятного числа) (Edwards C.A., 1991; Snyder L., Champness W., 1997). Более современные методы используют экстракцию бактериальной нуклеиновой кислоты (ДНК) дезоксирибозы и зондирование последовательностей генов,

специфичных для отдельных организмов или групп организмов, в сочетании с методом наиболее вероятного числа (Angle J.S., 2000). Были получены оценки 1×10^9 организмов / г почвы и >20 000 видов.

Бактерии демонстрируют почти безграничное разнообразие своего метаболизма и способности разлагать различные субстраты. Различают три основные подгруппы:

1. одноклеточные эубактерии - самая многочисленная группа, включающая как гетеротрофов, так и автотрофов;
2. разветвленные эубактерии или актиномицеты - это гетеротрофы, которые образуют более нежные мицелиальные образования, чем грибы. К ним относятся такие виды, как *Streptomyces*, которые производят антибиотики и могут разлагать более стойкие соединения С, такие как лигнин (Killham K., 1994). Некоторые термофильные актиномицеты обычны в высокотемпературных (> 50 °C) компостах;
3. *Myxobacteria* (слизистые бактерии) - эти одноклеточные организмы отличаются от *Eubacteria* гибкостью своих клеточных стенок и способом передвижения. Многие специализируются на разложении целлюлозы и хитина (Killham K., 1994).

Бактериальная популяция почвы превосходит популяцию всех других групп микроорганизмов как по количеству, так и по разнообразию. На данный момент известно о прямом микроскопическом подсчете до нескольких миллиардов бактерий на грамм почвы.

Популяция актиномицетов достигает миллионов на грамм почвы. В почве преобладают роды *Nocardia*, *Streptomyces* и *Micromonospora*. Эти организмы ответственны за характерный затхлый или землистый запах вскоре после дождя (Ramsey P.W. et al., 2005; Angle J. S., 2000). Это связано со спороношением актиномицетов. Актиномицеты способны разлагать многие сложные органические вещества и, следовательно, играют важную роль в повышении плодородия почвы. Актиномицеты обладают способностью

синтезировать и выделять антибиотики. Наличие в почве антибиотических веществ обнаруживается с большим трудом.

О численности грибов в почве известно, что их от тысяч до сотен тысяч на грамм почвы. Они аэробны по своей природе, и их больше встречается у поверхности земли. Они существуют в атмосфере как мицелиальная и споровая стадии. Грибы активны в разложении основных компонентов растительных тканей, а именно целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и пектина (Ramsey P.W. *et al.*, 2005).

Население водорослей в почве намного меньше, чем у бактерий или грибов. Основными видами, присутствующими в почве, являются зеленые водоросли и диатомовые водоросли. Их фотосинтетическая природа объясняет их преобладание на поверхности или чуть ниже поверхностного слоя почвы (Baldock J.A. and Nelson P.N., 2000; Ramsey P.W. *et al.*, 2005). В плодородной почве биохимическая активность водорослей маскируется бактериями и грибами. В определенных условиях водоросли совершают заметные и полезные изменения. Например, на бесплодных и эродированных землях они могут инициировать накопление органического вещества из-за своей способности осуществлять фотосинтез и другие метаболические процессы (Ramsey P.W. *et al.*, 2005).

Многие почвенные простейшие являются жгутиконосцами или амебами; население на грамм почвы колеблется от нескольких сотен до нескольких тысяч во влажных почвах, богатых органическими веществами (Angle J.S., 2000; Killham K., 1994). Простейшие имеют важное значение, поскольку их основной способ питания включает употребление бактерий.

1.3. Влияние микроорганизмов на урожайность сельскохозяйственных культур

Микроорганизмы участвуют в биогеохимическом круговороте питательных веществ, синтезе и разложении гумуса, агрегации почвы, стабилизации и мобилизации, а также переносе минеральных питательных веществ из почвы в растения. Азот (N) - это важнейшие питательные вещества, необходимые для улучшения роста растений и, в конечном итоге, растениеводства. Из-за загрязнения окружающей среды и токсичности растений, вызванных интенсивным использованием химических удобрений, активный подход к разработке биоудобрений осуществляется с помощью азотфиксирующих микробов, а также микробов, растворяющих фосфаты (Yang Y. *et al*, 2007). Эти микробные инокулянты стали надеждой для большинства стран с экономической и экологической точек зрения. Эти полезные микроорганизмы - лучшая альтернатива рекультивации пустошей по сравнению с химическими удобрениями. Они могут улучшить текстуру, структуру почвы и размножить полезные почвенные микроорганизмы.

Почва является важнейшей средой для выживания, роста и размножения микроорганизмов (Killham K., 1994). Физические и химические характеристики почвы различны в разных частях почвенного профиля. Остатки растений и животных, которые остаются в почве, вносят в нее органические вещества. Эти микроорганизмы влияют на структуру и плодородие почвы.

Почвенные микроорганизмы подразделяются на бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и простейшие. Каждая группа выполняет характерные функции в почвах (Mendes R. *et al.*, 2013). Популяция этих микробов в ризосферной зоне выше, чем в других зонах, из-за выработки растениями веществ, способствующих росту. Почвенные микроорганизмы расщепляют различные органические материалы и используют часть этих продуктов распада для образования или синтеза ряда соединений, которые

образуют гумус, аморфное вещество темного цвета, полисахариды, негуминовые вещества и гумин (Yang Y. *et al*., 2007). Эти материалы по-разному влияют на физические, химические и биохимические свойства почвы. Гумус улучшает текстуру и структуру почвы, способствует ее буферной способности и увеличивает водоудерживающую способность почвы.

Автотрофные бактерии более многочисленны в почве по сравнению с гетеротрофными бактериями, поскольку автотрофы получают свою энергию, производя свою собственную пищу путем окисления (виды *Nitrobacter*), а не питаясь растениями и другими видами (Angle J.S., 2000; Mendes R. *et al*., 2013). Эти бактерии играют важную роль в азотфиксации. Псевдомонады играют важную роль в антагонизме. Бактерии особенно многочисленны, чем другие основные группы организмов в почве. В хорошо аэрируемых почвах преобладают как бактерии, так и грибки, в то время как одни только бактерии ответственны за почти все биологические и химические изменения в окружающей среде, содержащей мало кислорода или не содержащую кислорода. Численность микробной популяции зависит от почвенных условий, таких как структура почвы, pH и другие параметры окружающей среды. На микробную активность почвы также влияют химические удобрения, органические добавки и другие методы возделывания сельскохозяйственных культур, такие как применение химикатов для защиты растений. Эти химические удобрения могут повлиять на количество и качество микробной популяции (Mendes R. *et al*., 2013).

Кларк (1949) предположил, что микрофлора почвы наиболее высока в ризосфере, поскольку наибольшая микробная активность наблюдается только в этом регионе (Bardgett R. D *et al*., 2014).

Агнихотруду (1953) при изучении ризосферной микрофлоры голубиного гороха, гроздей, фасоли сообщил о более высоком количестве бактерий в ризосфере, чем в не бобовых растениях (Mendes R. *et al*., 2013).

О преобладании в ризосфере пшеницы бактерий, продуцирующих фитогормоны, сообщил Ривьер (1963) (Angle J.S., 2000).

Существует множество отчетов, показывающих, что качество и количество микроорганизмов, присутствующих в ризосфере устойчивых к болезням сортов сельскохозяйственных культур, значительно отличается от этих восприимчивых сортов. В некоторых случаях организмы, специфически анатагонизирующие рассматриваемый патоген, были изолированы из ризосферы устойчивых сортов сельскохозяйственных культур, но не из восприимчивых (Angle J.S., 2000; Killham K., 1994).

Васантхараджан и Бхат (1967) рассмотрели работу по взаимодействию почвенных микроорганизмов и корней шелковицы и обсудили, что изоляты ризосферы более активны в синтезе фитогормонов, чем их почвенные аналоги (Bardgett R. D *et al*., 2014).

Почва, в которой растут растения, сильно различается по своим физическим и биологическим свойствам. На рост растений прямо и косвенно влияют несколько факторов. Почва, наполненная миллионами микроорганизмов, влияет на рост растений. В результате взаимодействие между почвой и растительными микробами становится четким и динамичным.

Роал и Вайдья (1988), работая с ризосферой и ризопланом сахара, выделили *Trichoderma harzianum* только из ризосферы (Bronick C.J., Lal R., 2005).

Pelczar и Martin (1997) также сообщили, что микроорганизмы в ризосфере размножаются лучше, чем где-либо еще, поскольку они получают питание из экссудатов корней, муцигеля растений и лизатов корней (Bronick C.J., Lal R., 2005).

Местное население в почве бедно, чего недостаточно для биологической фиксации азота, но популяция *Azotobacter* и *Azospirillum* в ризосфере пшеницы была в 8-10 раз больше, когда почва была внесена в почву с помощью навоза или биогумуса (Bardgett R. D *et al*., 2014).

Факторы окружающей среды и управления влияют на физиологическую активность почвенных организмов. Поразительные эффекты возникают, например, когда почва частично стерилизована токсичными химическими

веществами, такими как хлороформ или толуол. При восстановлении благоприятных условий быстрое размножение немногих выживших организмов, питающихся телами убитых организмов, вызывает прилив разложения, о чем свидетельствует всплеск производства CO_2 (Bardgett R., 2005). Подобные потоки разложения происходят в почвах, подвергающихся экстремальному увлажнению и высыханию, а также в почвах умеренных регионов при переходе от мерзлого состояния к талому. Помимо изменений в доступности микробных субстратов в этих ситуациях, могут быть изменения в других фракциях углерода, которые приводят к увеличению лабильного пула углерода почвы и, следовательно, большей активности биомассы (Bronick C.J., Lal R., 2005).

Органическое вещество почвы возникает из остатков зеленых растений, остатков животных и экскрементов, отложившихся на поверхности и смешанных в различной степени с минеральным компонентом. Мертвое органическое вещество заселяется различными почвенными организмами, в первую очередь микроорганизмами, которые получают энергию для роста в результате окислительного разложения сложных органических молекул (субстрата). Комбинация живого и мертвого органического вещества, независимо от его источника или стадии разложения (но исключая живые части растений над землей), называется органическим веществом почвы (ПОВ) (Bronick C.J., Lal R., 2005).

Во время разложения основные элементы превращаются из органических соединений в простые неорганические формы; этот процесс называется минерализацией (Bronick C.J., Lal R., 2005). Например, органически соединенные N, P и S появляются в виде ионов NH_4^+, $H_2PO_4^-$ и SO_4^{2-}, и примерно половина углерода выделяется в виде CO_2. Минерализация, особенно выброс CO_2, жизненно важна для роста следующих поколений зеленых растений. Остальная часть субстрата C, используемого микроорганизмами, включается в их клеточное вещество или микробную биомассу вместе с различной долей других важных элементов, таких как N, P

и S. Это включение делает эти элементы недоступными для роста растений до тех пор, пока организмы умирают и разлагаются, поэтому процесс называется иммобилизацией. Остатки организмов вместе с наиболее устойчивыми частями исходного субстрата накапливаются в почве. Различные взаимосвязанные процессы синтеза и разложения, посредством которых С циркулирует через почву, растения, животных и воздух - вместе биосферу - составляют углеродный цикл.

За последние 200 лет или около того, выброс CO_2 в результате сжигания ископаемого топлива, дыхания организмов, очистки земель и сжигания превысил связывание С в живых и мертвых организмах на суше и в. Это привело к неуклонному росту концентрации CO_2 в атмосфере, которая в настоящее время составляет 0,4% в год, и к тому, что было описано как усиленный «парниковый эффект» воде (Yang Y. *et al.*, 2007). В глобальном масштабе С в органическом веществе почвы является очень большим поглотителем, так что изменения динамического баланса между почвой, растительностью и атмосферой может существенно повлиять на чистый поток CO_2 в атмосферу. Действительно, изменение практики управления земельными ресурсами для достижения большего связывания углерода в ПОВ является частью общей стратегии по снижению чистых выбросов CO_2 в атмосферу. Это делает изучение ПОВ - его состава, накопления и разложения - очень важной темой.

Клетки растений состоят в основном из углеводов, белков и жиров, а также из меньшего количества органических кислот, лигнина, пигментов, восков и смол. Основу материала составляют углеводы, из которых сахара (глюкоза, фруктоза и сахароза) и крахмал быстро разлагаются, а гемицеллюлоза и целлюлоза разлагаются хуже (Альферманн А.В. и др., 1987; Никляев В.С. и др., 2000). Эти и другие реакции разложения катализируются ферментами, продуцируемыми специализированными группами микроорганизмов. Белки быстро метаболизируются, и протеолиз может начаться в стареющем листе до того, как он достигнет почвы. Конечными

продуктами являются аминокислоты, некоторые или все из которых могут использоваться микроорганизмами в синтезе белка. Наличие или отсутствие избытка амино-N для потребностей микроорганизмов, чтобы могла произойти чистая минерализация, зависит от соотношения C:N в субстрате и от свойств организмов-разлагателей. Обычно, когда соотношение C:N в субстрате >20, чистая иммобилизация вероятна, тогда как при соотношениях <20 чистая минерализация предпочтительна (Yang Y. *et al.*, 2007).

Соотношение C:N в растительных остатках и отходах - свежей подстилке и экскрементах животных - возвращаемых в почву, сильно варьируется. Но по мере того, как органическое вещество проходит через последовательные циклы разложения в почве, соотношение C:N постепенно сужается и обнаруживается, что соотношение C:N в хорошо дренированных почвах с pH ≈ 7 близко к 10 (Yang Y. *et al.*, 2007). Исключения случаются при плохом дренировании почвы или тех, на которых образуется моргумус.

Азот в сложных гетероциклических кольцевых соединениях, таких как хлорофилл, нелегко минерализовать, но хитин кутикулы насекомых и клеточных стенок грибов, полимер глюкозамина, в конечном итоге гидролизуется до глюкозы и ионов NH_4^+ (Bardgett R.D. *et al.*, 2014). Большинство растительных органических кислот легко разлагаются, но не полимеризованные сложные эфиры длинноцепочечных гидрокси «жирных кислот» (то есть сложных фосфолипидов), из которых состоят растительные воски и смолы, такие как кутин листьев и суберин корня. Эти материалы особенно устойчивы, как и лигнин, который представляет собой сложный фенольный полимер, который более стабилен, чем углеводы, и накапливается относительно этих компонентов во время разложения свежих остатков. Лигнин составляет значительную долю сухого вещества соломы зерновых (10–20%) и древесины (20–40%). Его гидролитическое окисление, катализируемое внеклеточными ферментами различных актиномицетов и грибов, дает моноциклические фенолы. Эти продукты разложения могут

служить предшественниками синтеза гуминовых макромолекул почвенными организмами (Bardgett R., 2005).

Разложение начинается с проникновения в стареющую растительную ткань поверхностных сапрофитов и протекает параллельно с биохимическими изменениями в стареющей ткани - синтезом ферментов протеазы, разрывом клеточных мембран с последующим смешением клеточных компонентов, а также самоокислением и полимеризацией. соединений фенольного типа (Bardgett R.D. *et al*., 2014; Bardgett R., 2005). Разложение ускоряется, о чем свидетельствует увеличение скорости производства CO_2, когда растительный материал падает на землю и в него вторгается множество почвенных организмов. Изменения, происходящие в растительных остатках, приводят не только к минерализации и иммобилизации питательных элементов, но и к синтезу новых соединений, менее подверженных разложению, которые в совокупности образуют аморфный материал от темно-коричневого до черного, называемый гумусом.

Полифенольные соединения, образующиеся в стареющих листьях, которые не вымываются дождем после их падения на землю, оказывают значительное влияние на скорость разложения остатков листьев. Это хорошо иллюстрируется контрастированием поверхностных слоев и горизонтов почв умеренных лесов. К образованию моргумуса предрасполагают высокие концентрации фенолов в стареющих листьях, которые осаждают цитоплазматические белки на клеточные стенки мезофилла, тем самым делая как белок, так и целлюлозу более устойчивыми к микробному разложению (Bronick C.J., Lal R., 2005). Этот процесс можно сравнить с «дублением» кожи, при котором танины растений (полифенолы) используются для сохранения белка шкур животных. Если растительные белки и целлюлоза не защищены дублением, эти составляющие, а также сахара и запасные углеводы быстро метаболизируются почвенными микроорганизмами, которые колонизируют подстилку в следующей последовательности:

сахарные грибы и неспорообразующие бактерии → спорообразующие грибы и бактерии → миксобактерии → актиномицеты.

Между деятельностью микрофлоры и мелких беспозвоночных в разложении органического вещества и образовании гумуса существует большая взаимозависимость. Исследования экологии почвенных организмов предполагают существование «пищевой сети» с несколькими трофическими (питательными) уровнями и сложными взаимодействиями между организмами на трофическом уровне и между уровнями. Внизу сети находится растительный мусор, корни и детрит организмов, питающихся на всех более высоких уровнях (включая надземный).

Количественное описание потоков энергии и питательных веществ (N, P и S) через такие пищевые сети помогает объяснить различия в продуктивности и физическом и биологическом состоянии между различными экосистемами, такими как пастбища, пахотные земли или фермы с высоким потреблением органических веществ, и дает указатель на их долгосрочную устойчивость. Хотя были предприняты попытки имитационных моделей пищевых сетей, требуемая информация настолько сложна, что в настоящее время невозможно проверить путем прямого измерения достоверность многих входных переменных и параметров модели (Bronick C.J., Lal R., 2005). Таким образом, оборот углерода и минерализация обычно описываются более прагматическими моделями, основанными на свойствах субстрата и скорости разложения.

Биохимические изменения, которые в целом включают гумификацию, сложны, потому что и деградационные, и синтетические процессы происходят одновременно. Несомненно, растительные углеводы и белки разлагаются и синтезируются их микробные аналоги, хотя последние также становятся субстратами, которые со временем разлагаются. Также происходят важные реакции полимеризации с участием ароматических соединений. Например, простые *о*- и *п*-гидроксифенолы, встречающиеся в естественных условиях в растениях или полученные в результате разложения лигнина и

полифенольных пигментов, подвергаются окислительной полимеризации с образованием гуминовых предшественников. Окисление может быть автокаталитическим или катализироваться полифенолоксидазами. Азот включается в полимеры, если аминокислоты конденсируются с фенолами до того, как происходит полимеризация. Некоторые из хиноновых колец, образующихся во время полимеризации, могут быть разорваны, и могут образоваться дополнительные карбоксильные группы, которые увеличивают кислотность карбоксильных групп в неароматических (то есть алкильных) боковых цепях. Карбоксилы и оставшиеся реакционноспособные фенольные-ОН-группы образуют соли или хелатные комплексы с ионами металлов, которые увеличивают стабильность макромолекулы. Их долговечность в почве также зависит от физической стабилизации за счет адсорбции на минеральных поверхностях.

Типичный элементный анализ гуминовых соединений, экстрагированных из почвы: 50–58% C, 5–6% H, 3–6% N и 30–33% O (Bardgett R., 2005). Ввиду разнообразия сложных молекул, которые могут быть образованы, это неудивительно, что идентификация химической структуры этих соединений оказалась сложной. Отношение C:H - это показатель ароматичности, минимальное значение которого равно 1, как для бензола. Значения >1 отражают степень конденсации колец и замещения H другими элементами в структуре (Yang Y. *et al.*, 2007).

Органическое вещество почвы измеряется путем сжигания образца почвы в печи для преобразования C в CO_2, который затем измеряется с помощью газовой хроматографии или путем улавливания в растворе щелочи и титрования. Необходимо внести поправку на содержание $CaCO_3$ в почве, и результат будет указан как органический C. В качестве альтернативы, ПОВ можно окислить влажным перевариванием в смеси серной кислоты и дихромата калия, а избыток дихромата титровать двухвалентным аммонием. сульфат - обычно называемый методом Уолкели – Блэка (Nelson D.W. and Sommers L.E., 1996). Поскольку окисление некоторых из наиболее устойчивых

ПОВ является неполным (включая древесный уголь), для преобразования в почвенный органический углерод используется средний коэффициент умножения 1,3. Значения ПОВ следует указывать в виде органического углерода (% или г / кг) в диапазоне от 5 до 150 г С / кг, за исключением торфа (гистозоли (ST) или органозоли (ASC)), в которых содержание может достигать 550 г С / кг (Yang Y. *et al.*, 2007; Nelson D.W. and Sommers L.E., 1996).

1.4. Ключевые группы хозяйственно-ценных почвенных микроорганизмов

Покровные культуры напрямую влияют на почвенное сообщество за счет роста корней и растительного покрова за зиму. Большинство организмов, встречающихся в почве, связаны с корнями растений, которые обеспечивают их углеродом и другими питательными веществами. Длительные периоды чистого пара могут нарушить структуру сообщества и снизить количество и активность почвенных организмов, особенно микоризных грибов. Физический покров на поверхности почвы также смягчает изменения температуры и влажности почвы, создавая в целом более благоприятную среду обитания для почвенных организмов.

Как правило, почва с растительностью поддерживает более высокие микробные популяции, чем паровая почва. Из корней растений выделяются такие соединения, как аминокислоты, простые сахара и органические кислоты, и они отщепляют клетки, содержащие полисахариды. Эти соединения обеспечивают непрерывное снабжение энергией микроорганизмов, живущих в корневой зоне (ризосфере). Исследования показали, что размер микробной биомассы колеблется в зависимости от сезона в ответ на рост сельскохозяйственных культур, таких как пшеница, из-за эффекта ризосферы (Lynch, J.M. and Panting L.M., 1980).

Производители часто рассматривают только минеральные формы основных питательных веществ для растений (азот, фосфор, сера). Однако другими важными источниками этих питательных веществ являются органическое вещество почвы и растительные остатки. Следовательно, запас потенциально доступного азота и других питательных веществ в органических формах связан с биомассой покровных культур. Количество азота, вносимого покровными культурами, намного больше, если покровная культура является бобовой и связывает азот, чем если это травяная культура. Органические формы фосфора и серы также связаны с покровными культурами. Хотя исследований доступности органического фосфора и серы было мало, вполне вероятно, что эти органические формы являются важным источником питательных веществ в определенных химических условиях почвы (например, при низком и высоком pH).

Также исследования показали, что поля, регулярно получающие органические удобрения в течение многих лет (например, в виде зеленых навозов или навоза), обычно имеют более крупные и более активные микробные популяции, чем поля, получающие синтетические удобрения (Scow K. M. *et al.*, 1994). Поскольку микробы часто ограничены доступным углеродом в сельскохозяйственных почвах, свежий органический материал, добавляемый в почву, стимулирует микробную активность. Повышение активности и биомассы прекращается, когда вводимые ресурсы исчерпываются и микробы погибают. Эти циклы подъема и спада микробной активности могут быть довольно быстрыми.

Численность микроорганизмов в почве, иными словами, показатель биогенности почвы, может колебаться не только в течение года, но и на протяжении незначительных промежутков времени в зависимости от его температуры, влажности, состояния растительного покрова и тому подобное.

Распространение тех или иных микроорганизмов в различных типах почв определяется не столько их географическим положением, сколько экологическими факторами. Например, *Azotobacter* развивается в почвах,

богатых доступными источниками органического вещества и соединения фосфора.

Основным геохимическим циклом биосферы является круговорот углерода, во время которого проходит синтез органического вещества из углекислого газа и его трансформация в более простые соединения (Lynch, J.M. and Panting L.M., 1980).

Также почвенным микроорганизмам свойственно выделять вещества, которые стимулируют рост и развитие лишайников(фитобионтов). В корневой зоне они синтезируют витамины (тиамин, витамин B12, пиридоксин, рибофлавин, пантотеновую кислоту и т.д.), а также фитогормоны (гиббереллины, гетероауксины и др.), что положительно влияет на развитие растений (Bardgett R., 2005; Lynch, J.M. and Panting L.M., 1980).

Важным фактором повышения плодородия почвы является функционирование в нем азотфиксирующих микроорганизмов. Азотфиксация - процесс, по масштабам и значимости для биосферы его сравниваемый с фотосинтезом (Lynch, J.M. and Panting L.M., 1980). Кроме того, азотфиксация - это единственный путь обеспечения растений азотом, который не ведет к нарушению экологического равновесия в окружающей среде, поскольку коэффициент использования растениями азотных удобрений в полевых условиях составляет только 20 - 25% (Scow K.M. *et al*., 1994).

Потребности растений в азоте более чем на 2/3 обеспечиваются за счет биологического азота. Азотфиксирующей активностью характеризуются представители разных родов клубеньковых бактерий, микроорганизмов родов *Clostridium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, синезеленых водорослей и других бактерий. В середине XX века считалось, что азотфиксирующие микроорганизмы принадлежат к двум основным группам: свободноживущим и симбиотическим азотфиксаторам. Хотя после проведенных исследований по функционированию в агроэкосистемах азотфиксирующих бактерий, принадлежащих к роду *Azospirillum*, стало известно, что существуют более

тесные и ассоциативные связи между азотфиксирующими микроорганизмами и растениями (Bronick C.J., Lal R., 2005).

Ассоциативные бактерии фиксируют заметные количества атмосферного азота. Так, в агроэкосистемах злаковых культур бактерии рода *Azospirillum* выполняют важную роль. В течение года в разных типах почв эти микроорганизмы могут фиксировать азота 34 - 60 кг/га (Bronick C.J., Lal R., 2005; Bardgett R., 2005; Lynch, J.M. and Panting L.M., 1980).

Более того, весомая роль в обновлении биосферы минеральным азотом принадлежит его симбиотрофной фиксации (Scow K.M. *et al*., 1994). Возбуждают этот процесс бактерии, образующие клубеньки на корнях или стеблях растений. Это микроорганизмы следующих родов: *Rhizobium* (6 видов), *Bradyrhizobium* (3 вида), *Sinorhizobium* (5 видов), *Mesorhizobium* (5 видов), *Azorhizobium* (1 вид). Эти виды бактерий способны к формированию эффективных симбиотических взаимоотношений по отношению к некоторым видам и сортам растений.

В природе в наибольших масштабах азот фиксируется ассоциативными микроорганизмами при их взаимодействии с растениями без образования специализированных органов - пузырьков. В зонах умеренного климата за счет ассоциативной азотфиксации ежегодно поступает около 30 – 50 кг азота/га, а в тропической зоне – 100 кг/га (Singer M. J. and Munns D. N., 1991; Jones L., 2014).

Наряду с азотфиксирующими микроорганизмами в состав микробных ценозов почв всегда входят различные виды бактерий, которые способны разлагать азотсодержащие органические вещества (Jones L., 2014). Процесс разложения этих веществ протекает с выделением аммония и называется аммонификацией. Аммиак, образующийся при этом, является субстратом для другой группы микроорганизмов – нитрификаторов. Процесс окисления аммония проходит узкоспециализированными бактериями в нитриты, потом – в нитраты, а в случае гетеротрофных микроорганизмов – в разные органические азотсодержащие соединения, называется нитрификацией.

Основными факторами этого процесса являются автотрофные бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. Много позже было доказано, что окислять аммоний и другие азотсодержащие соединения до нитрита и нитрата может значительное количество видов гетеротрофных микроорганизмов. Согласно имеющимся данным, гетеротрофная нитрификация играет важную, часто ведущую, роль в окислении восстановленных соединений азота (Lynch, J.M. and Panting L.M., 1980).

Важным процессом, который обусловлен функционированием микрофлоры почвы, является денитрификация. Этот процесс сопровождается снижением в почве минерального азота и может протекать под влиянием как анаэробных, так и аэробных микроорганизмов. В процессе денитрификации происходит восстановление нитрата через NO_2^-, NO, N_2O до N_2. Полный цепь нитратного дыхания функционирует только у некоторых видов бактерий, относящихся к родам *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* и др. Однако, часто дисимиляцийное восстановление нитратов заканчивается на промежуточных стадиях. Это наблюдается в условиях, неоптимальных для полной денитрификации, когда в данном процессе образуется N_2O (Shaffer M.J., 2001).

Фосфор является вторым важным элементом биосферы и занимает следующее место посте азота по влиянию на развитие растений.

В грунте фосфор может встречаться в форме таких органических соединений как фитин, глицерофосфат, остатки нуклеиновых кислот, а также в виде его труднорастворимых неорганических соединений. В фитине сосредоточено основное количество органического фосфора земли. В органических соединениях почвы содержание фосфора его общего количества может достигать 25 – 85%, а по отношению к органическому веществу почвы - 0,5 – 2,0%. 15 – 75% фосфора находится в почве в форме труднорастворимых неорганических соединений, которые входят в состав минералов (фторапатита, фосфоритов, вивианит и т.д.). В почве фосфор находится в труднодоступных для растений формах и даже при общей его содержания в

пахотном слое 1000 кг/га, в почвенном растворе его массосодержание не превышает килограмма (Patrick W.H. and Mahapatra I.C., 1968).

Несмотря на высокий процент содержания фосфора, в почве он присутствует в малоподвижных формах. Растения используют его всего лишь на 3 – 5%. При этом, фосфаты, вносимые в почву в составе удобрений, усваиваются растительными культурами с низким коэффициентом эффективности. В год внесения удобрений доступность фосфора растениям составляет 10 – 30% (Cole D.W. *et al*, 1967). Это обусловлено тем, что оксиды кальция, железа, алюминия и других элементов, а также глинистых минералов способны связывать и удерживать ионы фосфора (Halm B.J. *et al*., 1972).

Переводить фосфат из труднорастворимых соединений железа, алюминия и кальция способны широко распространенные в агроэкосистемах микроорганизмы: *Pseudomonas sp*., *Azotobacter sp*., *Enterobacter sp*., *Bacterium sp*., *Pseudomonas sp*., *Bacillus sp*., *Agrobacterium sp*., *Burkholderia sp*., *Aspergillus sp*., *Penicillium sp*., *Rhodotorula sp* (Cole D.W. *et al*, 1967).

Важное значение в питании растений принадлежит калию. Это необходимый и незаменимый для растений элемент, который влияет на физическое состояние коллоидов клеток, увеличивает гидрофильность протоплазмы и проводимость стенок клеток, определяет их тургор, устойчивость к некоторым неблагоприятным факторам среды (Cole D.W. *et al*, 1967). Без достаточного обеспечения калием снижается морозостойкость растений, их устойчивость к засухе, переувлажнению, вредителей и болезней. В течение роста растений калий находится, главным образом, в ионной форме и только около 1-2% - в составе белковых соединений клеток (Nelson D.W. and Sommers L.E., 1996).

Калий в почве присутствует в разнообразных формах: водорастворимом, обменном, тяжелообменном (резервный калий почвы), необменном (в том числе фиксированный калий), калий нерастворимых алюмосиликатов, калий органической части почвы (Cole D.W. *et al*, 1967). Водорастворимый калий находится в почвах в очень малых количествах.

Баланс калия определяется дозами калийных удобрений и навоза, уровнем применения азотно-фосфорных удобрений и биологическими особенностями культур. Интенсификация роста растений и увеличения их урожайности благодаря внесению азотных и фосфорных удобрений повышает использование культурами калия на 44 – 46% по сравнению с неудобренным фоном (Nelson D.W. and Sommers L.E., 1996; Cole D.W. *et al*, 1967).

1.5. Особенности гена 16s рРНК у почвенных микроорганизмов

16S рРНК представляет собой молекулу рибонуклеиновой кислоты, обнаруженную в рибосоме. Последовательность молекулы рРНК высоко консервативна среди прокариотических организмов, но у нее есть участки, которые изменяются быстрее, чем другие. Эти свойства делают молекулу рРНК и ее генную последовательность «полезным инструментом» для сравнения родства между двумя или более организмами. Последовательности гена 16S рРНК бактерий и архей были основными инструментами для идентификации популяций, населяющих почву, и для мониторинга динамики микробного сообщества (Justine R. Hall, 2020).

Ген 16S рРНК был основой для определения разнообразия микробного сообщества в течение нескольких десятилетий. Функциональные гены или межгенная спейсерная область секвенируются или используются для денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) или полиморфизма длины концевого рестрикционного фрагмента (T-RFLP), которые используются для изучения структуры сообщества между обработками, средами или для подтверждения филогении на основе 16S рРНК (Benson D.A. *et al.*, 2005).

Почва - одно из самых разнообразных мест обитания на Земле. У бактерий центральная роль в ризосфере, представляющую собой сложную и динамичную среду, изменяющуюся во времени пространстве и зависящую от

разнообразных методов ведения сельского хозяйства, которые способны влиять на сообщества почв.

Молекулярный анализ микробного разнообразия включает выделение последовательностей гена 16S рибосомальной РНК с помощью ПЦР-амплификации экстрагированных и очищенных нуклеиновых кислот с применением широкодиапазонных или группоспецифичных праймеров, с последующим анализом посредством клонирования и характеристики полученных клонов секвенированием. Хотя, идентификация всех продуктов ПЦР можно выполнить с использованием, к примеру, рестрикционного анализа амплифицированной рибосомной ДНК (рДНК), ПЦР на гетерогенность длины, однонитевого конформационного полиморфизма и T-RFLP (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984; Corless C.E. *et al.*, 2000). Наиболее часто используемые методы идентификации - это денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) и гель-электрофорез в температурном градиенте, которые разделяют последовательности на основе различий в денатурирующих свойствах и, следовательно, расстояниях миграции, в химических и температурных градиентах. Методы детекции позволяют более быстро сравнивать образцы и обычно их используют для выявления изменений в популяциях с течением времени или в различных условиях окружающей среды (Justine R. Hall *et al.*, 2020).

Ген 16S рРНК остается инструментом микробиологии окружающей среды из-за огромного количества последовательностей гена 16S рРНК в проекте базы данных рибосом (RDP) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984). Последовательности организмов, выделенных из почвы или обнаруженных в библиотеках почвенных клонов, плохо связаны с какими-либо ранее секвенированными организмами. Сравнение последовательностей с доступными базами данных - полезный первый шаг к характеристике неизвестной последовательности. Полноразмерные последовательности 16S рРНК с >97% считаются

принадлежащими к одному виду (Benson D.A. *et al.*, 2005). Идентификация видов микробов на основе 16S рРНК должна быть подтверждена генетическими или фенотипическими данными. Тщательное сопоставление неизвестных последовательностей с коллекцией (GenBank или The Ribosomal Database Project) похожих и несходных последовательностей. Выровненные последовательности можно сравнивать с помощью алгоритмов для определения их родства и построения филогенетического дерева. Это филогенетическое дерево помогает выявить их отличия от общего предка.

Подход клонирования позволил получить списки процентов последовательностей или классов полиморфизма длины рестрикционных фрагментов и их условные количества в библиотеках. Количественная оценка данных, собранных в библиотеках рДНК, ограничена небольшим числом клонов, которые могут реально подвергаться скринингу, но эти данные использовались для расчета индексов разнообразия (Stone B.W. *et al.*, 2021). Библиотеки клонов гена 16S рРНК можно использовать для оценки состава и разнообразия сообществ. Библиотека клонов, как принято, содержит набор гена 16S рРНК из продукта амплифицированной с помощью полимеразной цепной реакции для образца. Частота последовательностей в библиотеке клонов отражает частоту последовательности в организме (Peter H. Janssen, 2006). Генетический материал, т.е. клоны, могут быть объединены по шаблону ограничивающих фрагментов, более известному как операционные единицы таксона (OTU). Представителем каждой OTU могут быть последовательности, а частота уникальных операционных единиц может быть подсчитана и проанализирована с помощью экологических мер. Были разработаны новые статистические инструменты для непосредственного анализа библиотек клонов ДНК, которые назначают последовательности клонов из микробного сообщества в OTU на основе их последовательностей. Это можно использовать для оценки видового богатства и разнообразия (Peter H. Janssen, 2006; Jang M.J. *et al.*, 2021).

Ген 16S рРНК является предпочтительной «мишенью» для идентификации видов бактерий, определения разнообразия микробного сообщества и установления филогенетических отношений между неизвестными и некультивируемыми почвенными микроорганизмами.

Со времени первых новаторских исследований по изучению почвенных бактериальных сообществ с использованием молекулярно-экологических исследований, ряд библиотек генов 16S рРНК и 16S рРНК, полученных из почвы, стал доступным (Peter H. Janssen, 2006; Thijs S. *et al.*, 2017).

Анализ последовательности гена рибосомной РНК (рРНК) 16S широко используется для идентификации видов бактерий и проведения таксономических исследований (Justine R. Hall *et al.*, 2020). Бактериальные гены 16S рРНК обычно содержат девять «гипервариабельных областей», которые демонстрируют значительное разнообразие последовательностей среди различных видов бактерий и могут использоваться для идентификации видов.

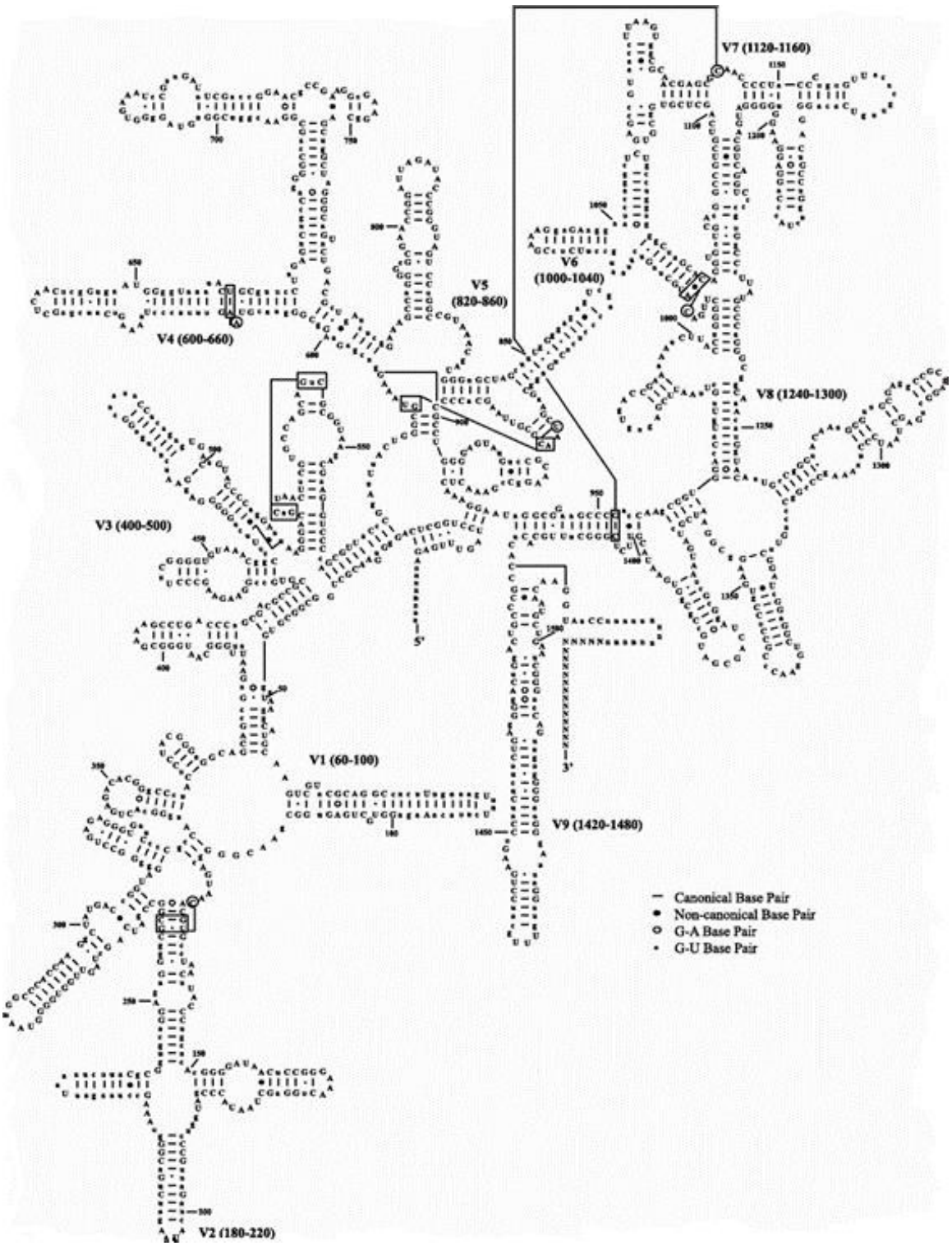

Рис. 2. Вторичная структура 16S рРНК. Вариабельные области обозначены буквой V с их номерами и положением. Источник: Justine R. Hall *et al.*, 2020.

Гипервариабельные области фланкированы консервативными участками у большинства бактерий, что делает возможным ПЦР-амплификацию целевых последовательностей с использованием универсальных праймеров (Benson D.A. *et al.*, 2005; Thijs S. *et al.*, 2017).

Многочисленные исследования выявили последовательности гипервариабельной области 16S рРНК, которые идентифицируют один бактериальный вид или дифференцируются среди ограниченного числа различных видов или родов (Jang M.J. *et al*., 2021). Также широко используются быстрые подходы, которые обнаруживают определенные видоспецифические последовательности в одной гипервариабельной области.

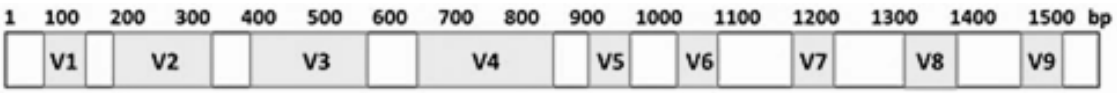

Рис.3. Вариативные и консервативные последовательности гена 16S рРНК

К сожалению, гипервариабельные области 16S рРНК демонстрируют разную степень разнообразия последовательностей, и ни одна гипервариабельная область не способна отличить все бактерии. В молекулярных диагностических методах, таких как ПЦР в реальном времени или анализ температуры плавления, обычно используются флуоресцентные зонды. которые гибридизуются с относительно короткими ампликонами (Peter H. Janssen, 2006; Jang M.J. *et al*., 2021). Это накладывает дополнительные ограничения на размер последовательности ДНК, которую можно использовать для идентификации видов бактерий в этих форматах анализа. Учитывая возрастающую важность ПЦР в реальном времени для медицинской диагностики, удивительно, что мало исследований было сосредоточено на сопоставлении коротких сегментов гипервариабельных участков гена 16S рРНК с общими патогенными или экологическими бактериями, которые можно дифференцировать по каждому сегменту.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Микробиологические методы

В первую очередь для получения ценных сельскохозяйственных культур требуется получить их накопительные культуры для дальнейшей работы.

Для сельского хозяйства очень важен процесс нитрификации, который проходит в почве, так как он улучшает плодородие, укрепляет и повышает рост растения, защищая от попадания патогенной микрофлоры.

Бактерии-нитрификаторы были открыты С.Н. Виноградским в конце XIX века, он показал, что при процессе нитрификации аммиак окисляется до азотной кислоты и имеет две фазы (Нетрусов А.И., Котова И.Б., 2009). Первая фаза нитрификации вызывается микроорганизмами рода *Nitrosomonas*, которые способны окислять аммиак до азотистой кислоты. Вторая фаза, в свою очередь, вызывается бактериями рода *Nitrobacter*, способными окислять азотистую кислоту до азотной. Обе эти бактерии всегда находятся в симбиозе в почве, соответственно, количество азотистой кислоты в почве не увеличивается.

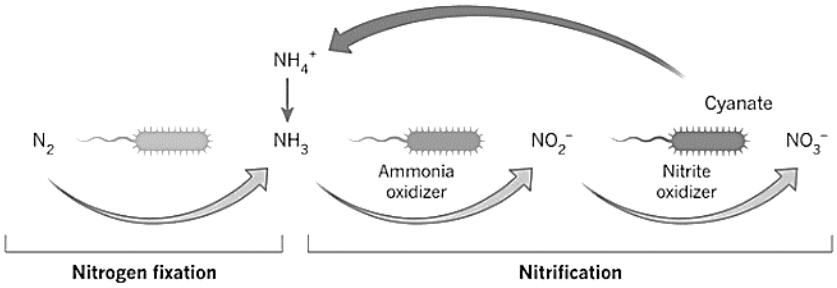

Рис. 4. Процесс нитрификации, проходящий в почве

Бактерии, окисляющие аммиак до азотистой кислоты или до азотной, очень чувствительны к органическому веществу, находящемуся в почве. Они подобно высшим растениям могут усваивать углекислоту из воздуха

(Перенков А.Д. и др., 2015). При этом, нитраты для высших растений являются важным источником азота.

Для выделения и получения чистых культур данного вида микроорганизмов следовало провести первичную подготовку к эксперименту: найти подходящий состав питательной среды и приготовить ее, а также подготовить необходимую посуду.

Для проведения эксперимента были простерилизованы в сухожаровом шкафу плоскодонные колбы на 250 мл (4 шт.) и чашки Петри (10 шт.) при температуре 170ºС длительностью 60 минут, пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл и наконечники для микропипеток разного объема (10, 100 и 1000 мкл) были простерилизованы в автоклаве при 120 ºС длительностью 45 минут.

Была приготовлена жидкая среда Виноградского для двух фаз для культивирования почвенных бактерий.

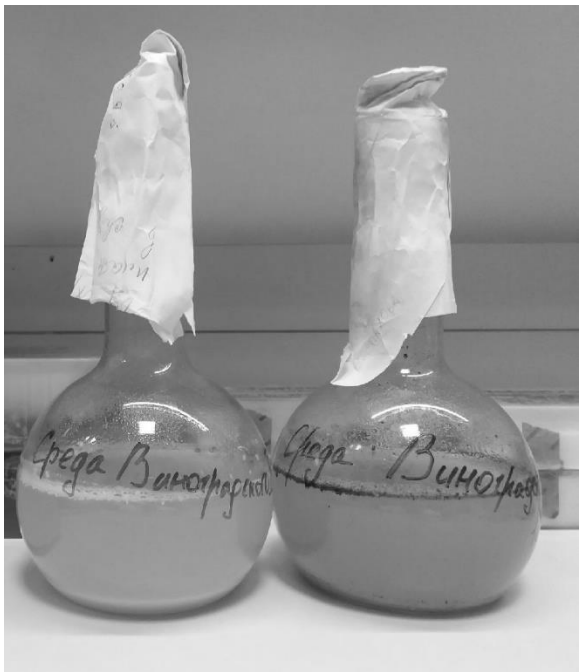

Рис. 5. Среда Виноградского для перво и второй фаз

Состав среды для первой фазы на литр в граммах:

- $(NH_4)_2SO_4$ - 0,2;
- K_2HPO_4 - 0,1;

- $MgSO_4*7H_2O$ - 0,5;
- NaCl – 2,0;
- $FeSO_4*7H_2O$ - 0,05;
- $CaCO_3$ - 0,5.

Состав среды для второй фазы на литр в граммах:

- $NaNO_2$ - 0,1;
- Na_2CO_3(безводный) - 0,1;
- NaCl - 0,05;
- K_2HPO_4 - 0,05;
- $MgSO_4*7H_2O$ - 0,05;
- $FeSO_4*7H_2O$ - 0,04.

Две жидкие питательные среды были приготовлены с водопроводной водой, соответственно рекомендациям, представленным в практикуме по микробиологии под редакцией Нетрусова А.И. (Нетрусов А.И. и др., 2005), в объеме 0,35 л и простерилизованы в автоклаве при давлении 101,3 кПа длительностью 45 мин.

В колбы с готовой жидкой средой Виноградского для I и II фаз было внесено по небольшому кусочку почвы для наращивания микробной биомассы в качестве накопительной культуры. После чего данные колбы были поставлены в термостат, поддерживающий постоянную температуру 30ºС на три недели, чтобы был заметен рост микроорганизмов, так как среда меняет цвет: становиться более темного оттенка. Для обеспечения лучшего культивирования колбы постоянно перемешивались на лабораторном шейкере в термостате.

Затем были приготовлены твердые питательные среды Виноградского для более удобного выделения чистых культур. Среды были разлиты по чашкам Петри (10 штук), куда были произведены посевы из культивируемых жидких сред с накопительной культурой.

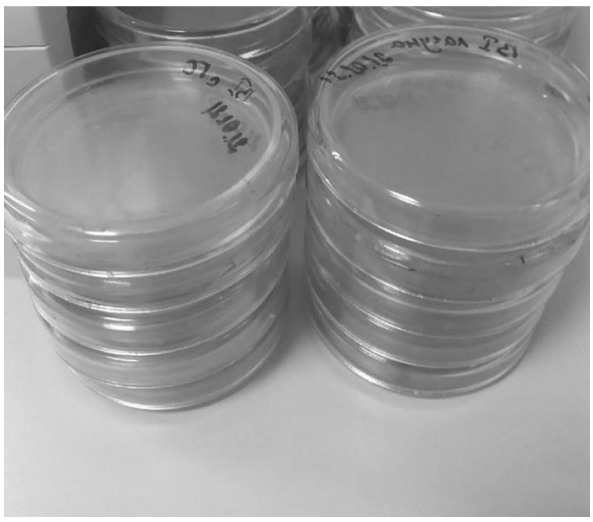

Рис. 6. Чашки Петри с посевами из жидких сред

После произведенного посева чашки Петри были поставлены в термостатирующий шкаф на оптимальную для роста бактерий, окисляющих аммиак, температуру - 30ºС. Характерно, что у этих бактерий наблюдался медленный рост, их можно было заметить через неделю после посева. Выделение чистых культур заняло пять недель, соответственно каждую неделю осуществлялся пересев микроорганизмов на новые свежие питательные среды.

2.2. Выделение геномных ДНК

Для удобства выделения ДНК из микробной биомассы, в пробирки Эппендорф 1,5 мл была внесена дистиллированная автоклавированная вода в объеме 200 мкл в каждую пробирку (10 штук), после чего были внесены соскобы микробной биомассы выделенных чистых культур. Затем они были доведены до однородного состояния.

Геномную ДНК каждого образца экстрагировали с помощью набора реагентов для выделения ДНК на микроколонках «К-сорб-50» (ЗАО «Синтол», г. Москва).

Рис. 7. Набор реагентов для выделения ДНК на микроколонках «К-сорб-50»

Все операции по выделению ДНК были выполнены согласно протоколу, приложенному к данному набору реагентов. Набор реагентов включал в себя протеиназу К, лизирующий раствор для лучшего выхода ДНК, осаждающий раствор, промывочный раствор для так называемой чистки ДНК и элюирующий раствор.

Высокая степень очистки ДНК достигается оптимизированным составом компонентов лизирующего и промывочных растворов. Также снижены потери ДНК и ее фрагментация при отмывках при сравнении с другими методами выделения. А концентрацию ДНК можно увеличить за счет уменьшения объема элюирующего раствора.

Выделение ДНК на колонках минимизирует расход дополнительного пластика. Технология выделения нуклеиновых кислот данным набором основывается на микроколонках со специальной сорбирующей мембраной, в состав которой входит диоксид кремния. Блягодаря присутствию в буфере хаотропной соли или этанола, нуклеиновые кислоты хорошо связываются с мембраной, после чего их отмывают от примесей и элюируют.

С помощью данной технологий обеспечивается высокая скорость выделения нуклеиновой кислоты, а ее количества достаточно для молекулярно-биологических манипуляций.

Нуклеиновую кислоту, связанную с колонкой, отмывают в присутствии 80% этанола. Из-за того, что во всех протоколах стадия фенол-хлороформной экстракции отсутствует, переосаждение спиртом устранено.

В составе набора имеются все необходимые буферы для выделения геномной ДНК, микроколонки с сорбирующей мембраной и специальные пробирки для сбора элюата во время центрифугирования.

После выделения ДНК каждого образца все пробирки были поставлены в холодильник, поддерживающий температуру -80 ºС.

На следующий день были посчитаны концентрации выделенной ДНК с помощью микропланшетного спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan GO.

Рис. 8. Измерение оптической плотности всех образцов выделенных ДНК с помощью микропланшетного спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan GO

Искомую оптическую плотность сравнивали с оптической плотностью «по нулю» (вода), эта же разница и показывала концентрацию ДНК образца. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Подсчет концентраций ДНК в пробах 1-10

№ образца		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Оптическая плотность	«По нулю»	0,052	0,048	0,051	0,05	0,046	0,049	0,044	0,045	0,052	0,044
	Образца	0,07	0,064	0,065	0,062	0,091	0,059	0,061	0,073	0,053	0,056
Разница		0,018	0,016	0,014	0,012	0,045	0,01	0,017	0,028	0,001	0,012
Концентрация ДНК образца, мкг/мл		18	16	14	12	45	10	17	28	1	12

2.3. Амплификация гена 16S рРНК

Расчет реакции основывался на том, что в одной пробирке 0,2 мл должны находиться реакционная смесь – 10 мкл, смесь праймеров – 7,5 мкл, матрица – 7,5 мкл.

Смесь праймеров была расчитана на 20 пробирок в стрипах: одного праймера в смеси по расчетам присутствовало 2 мкл и 196 мкл воды. Были применены праймеры для всего домена *Bacteria*: 27F и 1525R.

В ПЦР-смеси для амплификации гена 16S рРНК необходимая концентрация матрицы составляла 0,5 мкг/мл, соответственно. Также требовалось сделать необходимые расчеты для получения нужной концентрации матрицы, которую рассчитывали по следующей формуле: $C_1V_1 = C_2V_2$.

Таблица 2. Требуемая концентрация ДНК матриц для постановки ПЦР РВ

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрация ДНК образца, мкг/мл	18	16	14	12	45	10	17	28	1	12
Требуемый объем матрицы, мл	0,7	0,8	0,9	1	0,3	1,25	0,7	0,5	12,5	1

Из общего объема ДНК из каждой пробы, в двух повторностях, был отобран требуемый объем нуклеиновой кислоты для разведения в необходимом объеме воды, чтобы вышло по 7,5 мкг/мл каждой матрицы.

Для полной постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени требовалось проверить наличие необходимой программы амплификатора, в данном случае это 16S_23_09_20. Эта программа предназначена для амплификации ампликонов 16S рРНК каждого образца.

При проведении амплификации гена 16S рРНК использовались стерильные автоклавированные носики (наконечники) для дозаторов, а также пробирки типа Эппендорф 1,5 мл, стрипы.

Для проведения реакции амплификации были использованы реактивы ЗАО «Синтол» (г. Москва) готовой реакционной смеси 2,5-кратной с ПЦР-буфером, дезоксинуклеозид трифосфатами, $MgCl_2$ и Taq ДНК-полимеразой.

Смеси, которые были объёмом по 25 мкл каждая, содержали в своем составе по 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, по 7,5 мкл растворов приготовленных праймеров и по 7,5 мкл препарата ДНК-матрицы, выделенной из каждого образца.

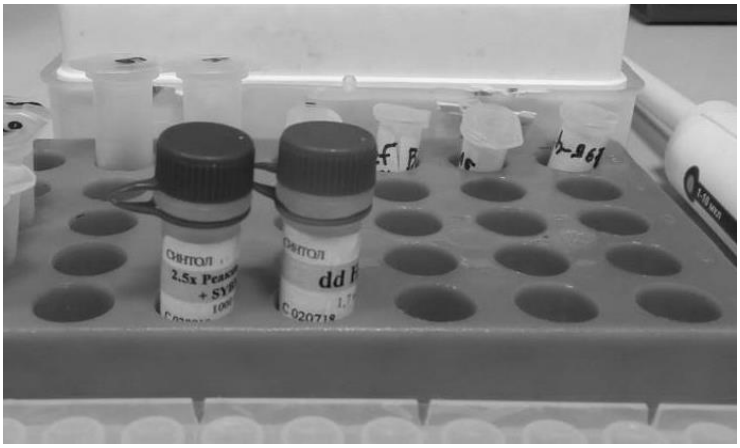

Рис. 9. Реакционная смесь и деионизированная вода ЗАО «Синтол» (г. Москва)

Реакция была проведена в термоциклере для ПЦР РВ CFX96 Touch фирмы «Bio-Rad».

Рис. 10. Постановка реакции амплификации генов 16S рРНК

Программа для амплификации содержала предшествующий этап плавления ДНК и активации ДНК-полимеразы при температуре 95 ºС продолжительностью 5 мин. За ним следовали 40 циклов амплификации, включающие: плавление при 95 ºС длительностью 1 мин, отжиг праймеров при 55 ºС – 1 мин и элонгацию при 72 ºС – 1,5 мин.

2.4. Выделение ампликонов из агарозного геля

После проведения ПРЦ РВ для амплификации генов 16S рРНК было замечено, что хороший результат показали пробы № 2, 3, 4, 9 и 10.

Для постановки электрофореза был приготовлен 10-кратный TBE и проведен горизонтальный электрофорез по протоколам, представленным ниже.

Приготовление 10-кратного TBE (10xTBE) на 1 литр:

Tris base – 108 g

Boric acid – 55 g

EDTA – 3,72 g

pH = 8-8,3 (доводить не нужно!)

Протокол проведения электрофореза:

1) Развести 500 мл 1xTBE в пропорции 1:9;

2) Приготовить 100 мл агарозного геля 1%-ного (2 г агарозы растворить в 1xTBE);

3) Гель остудить, залить в кювету с гребенкой;

4) Перенести гель в форезную камеру, внести пробы смешанные с краской, в лунки, подключить электроды.

Пробы, показавшие при амплификации гена 16S рРНК лучший результат, пробы № 2, 3, 4, 9 и 10, были внесены в лунки в двух повторностях. Электрофорез длился 30 – 45 минут при 200В.

Рис. 11. Проведение электрофореза

После проведения гель-электрофореза гель промывался в ядовитом бромистом этидие в течение 10 минут, затем в дистилированной автоклавированной воде – 10 минут, после чего просматривался на трансиллюминаторе под ультрафиолетовым светом.

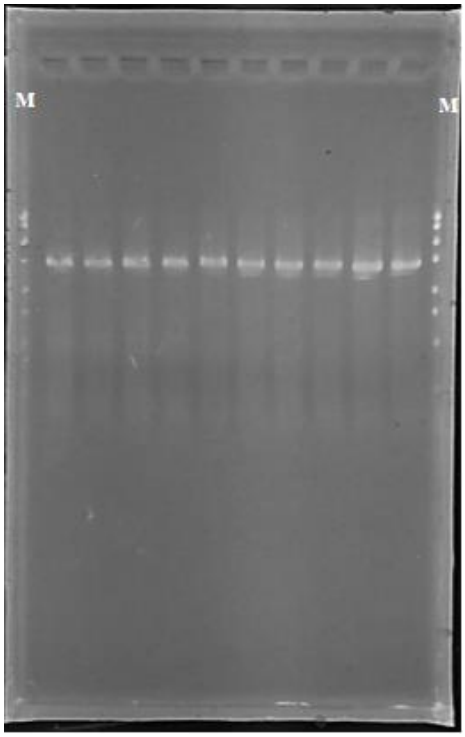

Рис. 12. Гель-электрофорез в агарозном геле: м – маркер молекулярной массы

На трансиллюминаторе гель-электрофорез показал по маркерам молекулярной массы, что длина каждого ампликона была 1500 п.н. После чего приступили к этапу выделения и очистки ампликонов из агарозного геля.

Гель разрезали на трансиллюминаторе: сначала разрезали по горизонтали и сделали насечки откуда нужно было вырезать ампликоны. После этого трансиллюминатор был выключен и гель с ампликонами был вырезан полностью и разложен по пробиркам.

10 пробирок Эппендорф 1,5 мл были взвешены на торсионных весах после чего туда были внесены ампликоны в геле и взвешены заново чтобы узнать вес геля.

Выделение ампликонов из агарозного геля проводили соответствующим набором фирмы diaGene (ООО «ДИА-М», г. Москва).

Рис. 13. Набор фирмы diaGene для элюции ДНК из агарозного геля (ООО «ДИА-М», г. Москва)

Проведение выделения ампликонов из агарозного геля осуществлялось согласно протоколу, прилагаемому к набору реагентов.

Данный набор используется для выделения и очистки фрагментов ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения нуклеиновых кислот. После отмывки препарата ДНК от примесей чистый препарат элюируется через колонку. Все стадии по выделению и очистке фрагментов ДНК из агарозного геля проводились с помощью центрифуги и прочего лабораторного оборудования.

2.5. Секвенирование генов 16S рРНК и обработка его результатов

Секвенирование генов 16S рРНК проводили по методу Сэнгера, с применением тех же самых праймеров, применяемых для амплификации ампиконов. Прочитывание последовательностей 16S рРНК проходило с двух сторон.

Для каждого из нуклеотидов, присутствующих в ДНК, обычно создаются четыре реакции секвенирования: аденозин, гуанин, цитозин и

тимин. В каждый реакционный сосуд добавляют один из четырех дезоксинуклеотидов (dATP, dGTP, dCTP или dTTP) (Justine R. Hall *et al.*, 2020).

Синтез ДНК начинается с праймера, связанного с цепью матрицы. Вторая цепь собирается поверх матрицы, образуя двухцепочечную ДНК. В конце процесса в каждом реакционном сосуде цепь обрывается всякий раз, когда ddNTP (дидеоксинуклеотид трифосфат) случайно включается, что приводит к цепям, длина которых соответствует всем местоположениям этого конкретного нуклеотида.

Учитывая размер и сложность генома, этот метод может быть трудоемким для выполнения вручную для любых последовательностей, кроме самых коротких. Секвенирование по Сэнгеру в настоящее время автоматизировано, поэтому секвенатор обрабатывает десятки партий ДНК в день и разделяет цепи с помощью капиллярного электрофореза. Следующим шагом в автоматизации и упрощении процесса является выполнение всей реакции на микрожидкостном чипе.

Одним из достижений секвенирования по Сэнгеру является метод определения красителя. Вместо проведения четырех реакций в четырех разных сосудах с использованием меченых праймеров разные ddNTP метят флуоресцентными красителями, каждый из которых излучает разную длину волны, поэтому четыре основания будут отображаться разными цветами при одновременном запуске на геле (Jang M.J. *et al.*, 2021). Секвенирование с использованием красителя-терминатора по Сэнгеру в настоящее время является предпочтительным методом автоматического секвенирования из-за его относительной простоты.

Секвенирование по Сэнгеру позволяет считывать цепи длиной до 800 пар оснований. Это основополагающий метод геномики, который до сих пор используется во многих приложениях, требующих малой длины чтения.

Результаты секвенирования по Сэнгеру представляют собой хроматограмму из нуклеотидов. Из этой хроматограммы можно получить последовательности, которые потом анализируют с помощью базы данных

GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), - последовательностей рибосомной РНК 16S для определения вида или рода. Самая высокая идентичность выбирается как идентифицированный вид или род.

2.6. Биоинформатический анализ изменчивости последовательностей 16S рРНК

Анализ внутривидовой изменчивости последовательностей 16S рРНК был проведен для проверки надёжности определения полученных видов по частичным последовательностям гена 16S рРНК.

Поиск всех последовательностей полученных результатов по секвенированию 16S рРНК проводился в базе данных Silva, при этом были выбраны последовательности длиной не менее 1500 пар нуклеотидов.

При помощи программы, созданной на высокоуровневом языке программирования общего назначения, на основе найденных последовательностей были получены консенсусные последовательности для обоих видов, включающие обозначения, которые характеризуют вариабельность позиций.

Таблица 3. Вырожденные позиции

R	A или G	**B**	C или G или T
Y	C или T	**D**	A или G или T
S	G или C	**H**	A или C или T
W	A или T	**V**	A или C или G
K	G или T	**N**	любой нуклеотид
M	A или C		

```
a=input().split()
c=str()
for x in range (0,len(a[0])):
    v = a[0][x]
    for i in range (0,len(a)):
        if len(v)==1:
            if a[i][x]!=v[0]:
                v=v+a[i][x]
        if len(v)==2:
            if a[i][x]!=v[1] and a[i][x]!=v[0]:
                v=v+a[i][x]
        if len(v)==3:
            if a[i][x]!=v[2] and a[i][x]!=v[1] and a[i][x]!=v[0]:
                v=v+a[i][x]
    if len(v)==1:
        c=c+v
    if len(v)>=4:
        c=c+'N'
    if len(v)==2:
        if v=='AT' or v=='TA':
            c=c+'W'
        if v=='AG' or v=='GA':
            c=c+'R'
        if v=='CT' or v=='TC':
            c=c+'Y'
        if v=='CG' or v=='GC':
            c=c+'S'
        if v=='GT' or v=='TG':
```

Рис. 14. Программа, созданная на языке Python, для получения консенсусных последовательностей

Консенсусная последовательность - это способ представления результатов множественного выравнивания последовательностей, где родственные последовательности сравниваются друг с другом и обнаруживаются сходные мотивы функциональных последовательностей. Консенсусная последовательность показывает, какие остатки наиболее многочисленны при выравнивании в каждом положении.

Полученные консенсусные последовательности были выровнены с последовательностью гена 16S рРНК *Aquifex pyrophilus* в программе «Clustal O». Также для выравнивания были применены прямые и обратные последовательности идентифицированных с помощью метода секвенирования по Сэнгеру микроорганизмов.

Последовательность гена *Aquifex pyrophilus* была выбрана как основная, потому что анализ литературных источников показал, что этот вид является одним из самых старых видов термофильных бактерий, обитающих в почве (Deckert G. et al., 1988; Burggraf S. *et al*., 1992; Shao Z. et al., 1994). Также данный микроорганизм способен восстанавливать азот в почве при анаэробном его росте (Burggraf S. *et al*., 1992).

Все последовательности, как консенсусные, так и геномная бактерии *Aquifex pyrophilus* были размечены согласно общепринятому делению последовательности 16S рРНК на вариабельные и консервативные участки.

Затем требовалось оценить изменчивость секвенированных вариабельных и консервативных участков генов 16S рРНК. Для этого была составлена еще одна программа на языке программирования Python для анализа изменчивости секвенированных вариабельных и консервативных участков 16S рРНК.

```
a=input(str())
b=int(0)
c=int(0)
for i in a:
    if i=='A' or i=='T' or i=='U' or i=='G' or i=='C':
        b=b+1
    elif i=='-' or i==' ' or i==''' or i=='\n' or i=='0' or i=='1' or i=='2'
        b=b+0
    else:
        c=c+1
print(b)
print(c)
e=b+c
print(e)
d=100*b/e
d=round(d,1)
print(str(d)+'%')
```

Рис.15. Программа, созданная на языке Python, для анализа изменчивости вариабельных и консервативных участков

Затем были вычислены и сопоставлены уровни консервативности для вариабельных и консервативных участков.

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение

3.1. Выделение чистых культур почвенных бактерий

С помощью трехнедельного культивирования в жидких средах в термостате с периодическим перемешиванием на шейкере была получена микробная биомасса, об этом свидетельствовал изменившийся цвет среды Виноградского для I и II фаз: он стал темнее.

После чего из каждой колбы был произведен посев культуральной жидкости с нарощенной биомассой в пять чашек Петри в объеме 100 микролитров на твердые питательные среды Виноградского, с добавлением агара. Микроорганизмам, способным расти на этой среде, характерен медленный рост, при этом оптимальная температура – 30℃. Чтобы был заметен рост культур потребовалось пять недель для их выделения в чистые культуры.

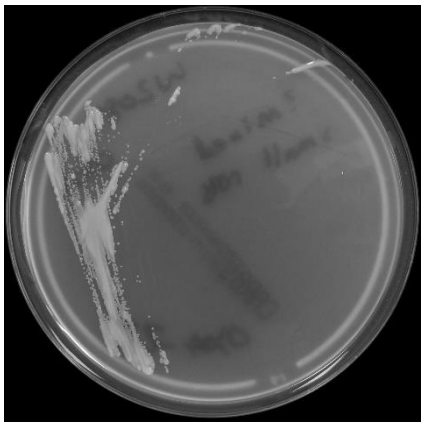

Рис. 16. Пример чистой культуры на среде Виноградского I фазы

Рис. 17. Пример чистой культуры на среде Виноградского II фазы

3.2. Получение препаратов ампликонов 16S рРНК и их секвенирование

Для получения препаратов ампликонов требовалось выделить геномную ДНК каждого выделенного микроорганизма и получить ампликон его геномной ДНК.

Ампликоны 16S рРНК были получены при помощи праймеров 27F и 1525R. С помощью методики электрофореза в 1%-ом агарозном геле была проведена оценка веса (длины) ампликонов. Эти данные использовались для определения количества внесения буфера для очистки ампликонов от геля.

Таблица 4. Вес полученнных ампликонов в агарозном геле

№ пробы	Вес пробирки Эппендорф 1,5 мл, г	Вес пробирки Эппендорф 1,5 мл с ампликоном в агарозном геле, г	Разница, г	Количство внесенного буфера для очистки, мкл
1	0,994	1,120	0,126	378
2	0,982	1,110	0,128	384
3	1,0	1,124	0,124	372
4	0,978	1,129	0,151	453
5	0,991	1,140	0,149	447
6	0,986	1,151	0,165	495
7	1,002	1,159	0,157	471
8	0,979	1,163	0,184	552
9	0,985	1,188	0,203	609
10	0,987	1,157	0,17	510

Очищенные ампликоны секвенировали по методу Сэнгера при помощи праймеров, которые применялись для амплификации. Были получены два разнонаправленных прочтения. Участки, которые характеризовались низким качеством прочтения, отбрасывались на основании анализа хроматограммы.

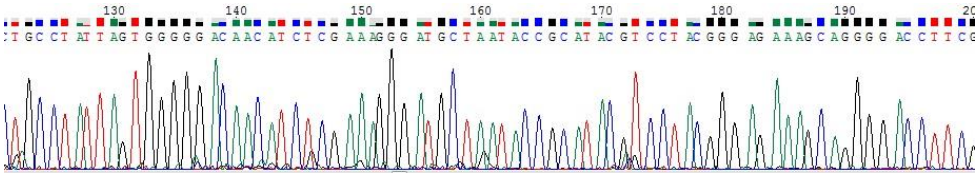

Рис. 18. Хроматограмма секвенирования по Сэнгеру

```
>b1 62-405
AGGGGGGAGGGAGGGACCGGGCAGTGAAGAGCTGGCGGCGGCTAGAATACATGCAAATCG
GCGGGGGAAAAGTAGCTTGCTACTTGACATACGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAAT
CTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGG
GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTGGGTAGTAA
AGCAGTAGAAGCGAGGAG
```

Рис. 19. Результат секвенирования одного из 5 образцов ампликонов (серым выделены участки с низким уровнем прочтения)

Результаты секвенирования ампликонов 16S рРНК показали, что выделенными нами видами почвенных микроорганизмов являются *Acinetobacter lwoffii* и *Paenibacillus taichungensis*.

3.3. Биоинформатический анализ изменчивости последовательностей 16S рРНК

Поиск в базе данных Silva показал, что последовательностей *Acinetobacter lwoffii* и *Paenibacillus taichungensis*, длиной 1500 п.н. и больше было обнаружено 30 и 6 штук соответственно.

С помощью написанного нами компьютерного алгоритма были получены консенсусные последовательности по каждому виду, с учетом вырожденных позиций. После чего в программе «Clustal O» были выровнены консенсусные последовательности, последовательность гена 16S рРНК *Aquifex pyrophilus* и полученные прочтения с двух сторон каждого из ампликонов выделенных видов микроорганизмов. Вариабельные и

консервативные участки были размечены по общепринятому делению (Приложение №1).

Затем была поставлена оценка изменчивости, а также вычислены и сопоставлены уровни консервативности и вариабельности вариабельных участков.

Таблица 5. Уровни изменчивости консервативных и вариабельных участков генов 16S рРНК

Участок (консервативный / вариабельный)	Позиции участка (нумерация по *Aquifex pyrophilus*)	Длина	% совпадений у *Acinetobacter lwoffii*	% совпадений у *Paenibacillus taichungensis*
Консервативный(К) 1	0 – 59	59	58,0	87,8
Вариабельный(В) 1	60 – 100	40	57,4	86,0
К2	101 – 179	78	89,9	98,8
В2	180 – 220	40	88,2	84,6
К3	221 – 399	178	96,8	97,8
В3	400 – 500	100	80,8	94,9
К4	501 – 599	98	98,0	100,0
В4	600 – 660	60	83,3	100,0
К5	661 – 819	158	96,1	98,7
В5	820 -860	40	100,0	95,1
К6	861 – 999	138	100,0	98,6
В6	1000 – 1040	40	100,0	100,0
К7	1041 – 1119	78	100,0	98,6
В7	1120 – 1160	40	97,5	100,0
К8	1159 – 1239	80	97,5	96,2
В8	1240 – 1300	60	96,6	95,0
К9	1301 – 1419	118	100,0	99,2
В9	1420 – 1480	60	95,0	98,3
К10	1481 – 1564	83	86,0	81,0

Таким образом, было определено, что наиболее выражена внутривидовая изменчивость вариабельных участков 1, 2 и 3 (у *A. lwoffii* также 4). Участок 2 секвенируется при помощи праймера 27F полностью, а 1 и 3 частично.

Вариабельные участки 6, 7, 8, 9, секвенируемые при помощи праймера 1525R характеризуются меньшей внутривидовой изменчивостью, в частности, участок 6 консервативен в пределах обоих видов.

Следует отметить, что примененный метод амплификации для секвенирования ампликонов 16S рРНК позволяет получить информацию и вариабельности и консервативности последовательностей, которые имеются в гене 16S рРНК обоих выделенных нами видов *A. lwoffii* и *P. taichungensis*.

Также было замечено, что последовательности, которые выделяют как консервативные и вариабельные на высоких таксономических уровнях, характеризуются похожей изменчивостью на внутривидовом уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Взаимодействие между растениями и почвенными микробами является важным фактором функционирования экосистем, структуры и разнообразия растительного сообщества. Почвенные микробы помогают растениям усваивать питательные вещества в легкоусвояемых формах. Несмотря на это, бактерии способны влиять на продуктивность видов и групп растений и, соответственно, на круговорот растительного сообщества, а также оказывать косвенное влияние на управление земельными ресурсами и условия окружающей среды.

Развитие молекулярных технологий позволяет преодолеть проблемы, связанные с методами, основанными на культивировании. В настоящее время в почвоведении и почвенной микробиологии используются разные методы для изучения разнообразия и экологии почвенных микроорганизмов. Общие процедуры исследования микробных сообществ включают выделение и очистку ДНК из образца, амплификацию с использованием ПЦР с последующим анализом нуклеотидной последовательности.

Таким образом, примененный в данной работе метод амплификации гена 16S рРНК для дальнейшего секвенирования ампликонов обеспечивает получение данных о вариабельных и консервативных последовательностях, имеющихся в гене 16S рРНК видов *Acinetobacter lwoffii* и *Paenibacillus taichungensis*, характеризующихся сходными значениями изменчивости на внутривидовом уровне.

В ходе исследования:

1) Получены чистые культуры двух видов почвенных бактерий, способных к росту на среде Виноградского.

2) Из полученных культур выделены геномные ДНК, получены и очищены ампликоны гена 16S рРНК.

3) Культивируемые виды определены по последовательности 16S рРНК как *Acinetobacter lwoffii* и *Paenibacillus taichungensis*.

4) При помощи созданного компьютерного алгоритма получены консенсусные последовательности генов 16S рРНК обоих видов.

5) При помощи другого созданного алгоритма проведён сравнительный анализ изменчивости традиционно выделяемых вариабельных и консервативных участков генов двух исследуемых видов.

6) Применяемый метод получения ампликонов 16S рРНК, основанный на использовании праймеров 27F и 1525R, позволяет получать данные о первичной структуре участков, характеризующихся различными уровнями внутривидовой изменчивости.

7) Традиционно выделяемые вариабельные и консервативные участки 16S рРНК в слабой мере отражают распределение уровней внутривидовой изменчивости по участкам этой молекулы у изучаемых видов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альферманн А.В., Бергманн В., Брайт С. и др. Биотехнология сельскохозяйственных растений / пер. с англ. В. И. Негрука; предисл. Р. Г. Бутенко. - М.: Агропромиздат, 1987. - 301 с.

2. Микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / Нетрусов А.И., Котова И.Б. – 3-е изд., испр. – М. : издательский центр «Академия», 2009. – 352 с.

3. Минеев В.Г. Агрохимия: Учебник / Минеев В.Г., Сычёв В.Г., Гамзиков Г.П. и др.; под ред. Минеева В.Г. – М.: Изд-во ВНИИА им. Д.Н. Прянишникова, 2017. – 854 с.

4. Мишустин Е.Н. Биологическая фиксация атмосферного азота / Е. Н. Мишустин, В. К. Шильникова; АН СССР. Ин-т микробиологии. Моск. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева. - Москва: Наука, 1968. - 531 с.

5. Никляев В.С., Косинский В.С., Ткачев В.В., Сучилина А.А. Основы технологии сельскохозяйственного производства. Земледелие и растениеводство. – Москва: «Былина», 2000. – 555с.

6. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: Учебно-методическое пособие. Авторы: Перенков А.Д., Новиков Д.В., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б., Калугин А.В., Касатова Е.С., Новиков В.В.: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44 с.

7. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.; под ред. Нетрусова А.И. - М. : издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

8. Трепачев Е.П. Агрохимические аспекты биологического азота в современном земледелии / Е.П. Трепачев. - М., 1999. - 531 с.

9. Alexander M. Introduction to soil microbiology, 2nd ed. - John Wiley and Sons, N.Y., 1977.

10. Angle J.S. Bacteria, in *Handbook of Soil Science* (Ed. M. E. Sumner). CRC Press, Boca Raton, Florida, 2000.

11. Baldock J.A. and Nelson P.N. Soil organic matter in, *Handbook of Soil Science* (Ed. M. E. Sumner). CRC Press, Boca Raton, Florida, 2000.

12. Bardgett R. D., Mommer L., De Vries F. T. Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. // Trends Ecol. Evol. – 2014. – Vol. 29. – pp. 692–699.

13. Bardgett R., The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach, Oxford University. Press, UK, 2005, p. 242.

14. Barrios E. Soil biota, ecosystem services and land productivity // Ecol. Econ. – 2007. – Vol. 64. – pp. 269 - 285.

15. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., and Wheeler D.L. GenBank. Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 33:

16. Bethlenfalvay, G. J., and Lindermann R. G. Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison, WI: American Society of Agronomy, Special Publication 54, 1992.

17. Bronick C.J., Lal R., Soil structure and management: a review // Geoderma. – 2005. – Vol. 124. – pp. 3 - 22.

18. Brown, P. E., "Bacteria and Soil Fertility". Circular. Paper 7, 1913.

19. Burggraf S., Olsen G.J., Stetter K.O., Woese C.R. A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. // Syst Appl Microbiol. – 1992. – Vol. 15, No. 3. – pp. 352-6.

20. Chiariello, N., Hickman J.C., and Mooney H.A. Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorous in a community of annual plants. // Science, - 1982. – Vol. 217(3). – pp. 941–943.

21. Cole D.W., Gessel S.P. and Dice S.F. Distribution and cycling of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in a second-growth Douglas fir ecosystem, in *Primary Productivity and Mineral Cycling in Natural Ecosystems* (Ed. H. E. Young). Ecological Society of America, New York, 1967.

22. Coleman, D.C., Reid C.P.P., and Cole C.V. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems // Annual Review of Ecological Systems. - 1983. – Vol. 13. – pp. 1–56.

23. Corless C.E., Guiver M., Borrow R., *et al*. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. // J Clin Microbiol – 2000. - Vol. 38. – pp. 1747-1752.

24. Crawford J.W., Harris J.A., Ritz K., Young I.M., Towards an evolutionary ecology of life in soil // Trends Ecol. Evol. – 2005. – Vol. 20. – pp. 81 - 87.

25. Decaens T. Macroecological patterns in soil communities // Global Ecol. Biogeogr. – 2010. – Vol. 19. – pp. 287-302.

26. Deckert G., Warren P., Gaasterland T. et al. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. // Nature. – 1998. – Vol. 392. – pp. 353–358.

27. Doran J.W., Sarrantonio M., Liebig M. Soil health and sustainability in: D.L. Sparks (Ed.) // Advances in Agronomy. - 1996. - Vol. 56. - pp. 1 - 54.

28. Doran J.W., Zeiss M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality // Appl. Soil Ecol. – 2000. - Vol. 15. - pp. 3 - 11.

29. Edwards C.A. The assessment of populations of soil-inhabiting invertebrates // Agriculture, Ecosystems and Environment. – 1991. – Vol. 34. – pp. 145–76.

30. Giller P.S. The diversity of soil communities, the ‘poor man’s tropical rainforest’ // Biodivers. Conserv. – 1996. – Vol. 5. -pp. 135-168.

31. Gil-Sotres F., Trasar-Cepeda C., Leiros M.C., Seoane S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties // Soil Biol. Biochem. – 2005. – Vol. 37. – pp. 877 - 887.

32. Halm B.J., Stewart J.W.B. and Halstead R.L. The phosphorus cycle in a native grassland ecosystem, in Isotopes and Radiation in Soil-plant Relationships

including Forestry. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1972, pp. 571–86.

33. Hussey, R. S., and Roncadori R. W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. // Plant Disease, - 1982. – Vol. 66(1). – pp. 9–14.

34. Jang M.J., Kim S.Y., Ricke S.C., Rhee M.S., Kim S.A. Microbial ecology of alfalfa, radish, and rapeseed sprouts based on culture methods and 16S rRNA microbiome sequencing. // Food Res Int. – 2021. – Vol. 144.

35. Jones L., Provins A., Holland M., Mills G., Hayes F., Emmett B., et al., A review and application of the evidence for nitrogen impacts on ecosystem services // Ecosyst. Serv. – 2014. – Vol. 7. – pp. 76 - 88.

36. Justine R. Hall, Kendra R. Mitchell, Olan Jackson-Weaver, Ara S. Kooser, Brandi R. Cron, Laura J. Crossey, and Cristina D. Takacs-Vesbach Molecular Characterization of the Diversity and Distribution of a Thermal Spring Microbial Community by Using rRNA and Metabolic Genes // Applied and Environmental Microbiology. - 2020. - Vol. 74, No. 15.

37. Kibblewhite M.G., Ritz K., Swift M.J. Soil health in agricultural systems // Philos. Trans. R. Soc. – 2008. – Vol. 363 - pp. 685 - 701.

38. Killham K. Soil Ecology. Cambridge University Press, Cambridge, 1994.

39. Killham K. Soil ecology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

40. Lavelle P., Spain A.V. Soil Ecology // Springer Science & Business Media – 2001. - 654 pp.

41. Lindermann, R. G. VA (Vesicular-Arbuscular) mycorrhizal symbiosis // ISI Atlas of Animal and Plant Science, - 1988. – Vol. 1(2). – pp. 183–188.

42. Lynch, J.M. and Panting L.M. Cultivation and the soil biomass. // Soil Biology and Biochemistry. – 1980. – Vol. 12. – pp. 29–33.

43. Marinari S., Mancinelli R., Campiglia E., Grego S. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy // Ecol. Indic. – 2006. – Vol. 6. – pp. 701 - 711.

44. Marumoto, T., Anderson J.P.E., and Domsch K.H. Mineralization of nutrients from soil microbial biomass // Soil Biology and Biochemistry. - 1982. – Vol. 14. – pp. 469–475.

45. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. // FEMS Microbiol. Rev. – 2013. – Vol. 37. – pp. 634 – 663.

46. Morgado, R. G., Loureiro, S., & González-Alcaraz, M. N. Changes in Soil Ecosystem Structure and Functions Due to Soil Contamination. // Soil Pollution. – 2018. – pp. 59–87.

47. Nelson D.W. and Sommers L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter in, *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. (Ed. D. L. Sparks). Soil Science Society of America Book Series No. 5, 1996, pp. 961–1010.

48. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). "Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences". // Nucleic Acids Research. – 1984. – Vol. 13, No. 9. – pp. 3021 - 3030.

49. Patrick W.H. and Mahapatra I.C. Transformation and availability to rice of nitrogen and phosphorus in waterlogged soils. // Advances in Agronomy. – 1968. - Vol. 20. – pp. 323–59.

50. Paul E.A. and Clark F.E. Soil microbiology and biochemistry. San Diego: Academic Press, 1989.

51. Paul, E.A., and Voroney R.P. Field interpretation of microbial biomass activity measurements. In M. J. Klug and C.A. Reddy, eds., // Current Perspectives in microbial ecology. Washington, DC: American Society. of Microbiology, 1984.

52. Perrin, R. Interactions between mycorrhizae and diseases caused by soilborne fungi // Soil Use and Management, - 1990. – Vol. 6(4). – pp. 189–195.

53. Peter H. Janssen Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, No. 3. - pp. 1719 - 1728.

54. Ramsey P.W., Rillig M.C., Feris K.P., Gordon N.S., Moore J.N., Holben W.E. et al., Relationship between communities and processes; new insights from a field study of a contaminated ecosystem // Ecol. Lett. – 2005. – Vol. 8. – pp. 1201 -1210.

55. Schloter M., Dilly O., Munch J.C. Indicators for evaluating soil quality // Agric. Ecosyst. Environ. – 2003. - Vol. 98. – pp. 255 - 262.

56. Scow, K. M., O. Somasco, N. Gunapala, S. Lau, R. Venette, H. Ferris, R. Miller, and C. Shennan Changes in soil fertility and biology during the transition from conventional to low-input and organic farming systems // California Agriculture. – 1994. - Volume 48. – pp. 20–26.

57. Shaffer M. J., Liwang M., Hansen S. (Eds) Modeling Carbon and Nitrogen Dynamics for Soil Management. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 2001.

58. Shao Z., Mages W., Schmitt R. A physical map of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus* chromosome. // Journal of bacteriology. -1994. – Vol. 176. – pp. 6776-80.

59. Singer M. J. and Munns D. N. Soils, an introduction. 2d ed. - New York: Macmillan, 1991.

60. Snyder L., Champness W. Molecular genetics of bacteria. // ASM Press, 1997.- 503 p.

61. Stone B.W., Li J., Koch B.J. *et al.* Nutrients cause consolidation of soil carbon flux to small proportion of bacterial community. // Nat Commun – 2021. – Vol. 12. – p. 3381.

62. Thijs S., op de Beeck M., Beckers B., Truyens S., Stevens V., van Hamme J. D., Weyens N., Vangronsveld J. Comparative Evaluation of Four Bacteria-Specific Primer Pairs for 16S rRNA Gene Surveys // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. - Article 494.

63. Yang Y., Chen Y.X., Tian G.M., Zhang Z.J., Dynamics of microbial activity related to N cycling in Cd-contaminated soil during growth of soybean // Pedosphere. – 2007. – Vol. 17. – pp. 383 - 388.

64. Zarraonaindia I. The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota / Zarraonaindia I., Owens S.M., Weisenhorn P., West K., Hampton-Marcell J., Lax S., Bokulich N.A., Mills D.A., Gilles M., Taghavi S., van der Lelie D., Gilbert J.A. // mBio – 2015. - Volume 6 - Issue 2.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

Выравнивание и анализ изменчивости секвенированных вариабельных и консервативных участков 16S рРНК (серым цветом отмечены участки, представленные в половине или менее последовательностей, использовавшихся при получении консенсусной последовательности)

```
                                                        58,0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   0
A.lwoffii-30            --------GGWYYARARWWDRWWCMUGCUCAGAUYGWAYGMUGRMKRCAKGCUUAASWCA   52
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     ----UUCCCUGAAGAGUUUGAUCCUGGCUCAGCGCGAACGCUGGCGGCGUGCCUAACACA   56
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   0
P.taichungensis-6       GGGAUCGCCCUUAGAGUUUGWWCMUGGCUCAGGACGAAYGCYKKCGGCAUGCCUAAUACA   60
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0
                                                       87,8%

                                                57,4%                   33,3%
A.lwoffi-F              ------------------------------------GGGGGAAAAGTAGCTTGCTACTTGA   25
A.lwoffii-30            URCRAGKCGARCGRRBRRANNKGAAACAUCUCAGUAYVSYUHGSWAAAGAAAUCAMNKNA   112
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     UGCAAGUCGUGCGCAGGCUCGCUCCCUC--UGGG-----------------AGCGGGUGC   97
P.taichungensis-F       ------------GCGGATTGAGAGAAGCTT-GCT-----------------TCTCCGAGG   30
P.taichungensis-6       UGCAWGUCGAGCGGACUKGAWGAGAAGCUUGCUU-----------------CUCWRAURG   103
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0
                                                86,0%                   81,2%

                                                        89,9%
A.lwoffi-F              CATACGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAA-TCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCT   84
A.lwoffii-30            BHYWSCGGCGGMYSGUGAGUAAUGCUUAGGAA-UCUGCCUAUUAGUGGGGGACAACAUYY   171
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     UGAGCGGCAAACGGGUGAGUAACACGUGGGUAACCUACCCCCAGGAGGGGGAUAACCCCG   157
P.taichungensis-F       TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGTTTGGGACAACTACC   90
P.taichungensis-6       UUAGCGGCGGACGGGUGAGUAACACGUAGGCAACCUGCCCUCAAGYUUGGGACAACUACC   163
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0
                                                        98,8%

                                                                        88,2%
A.lwoffi-F              CGAAAGGGATGCTAATACCGCATAC-----------------------GTCCTACGGGAG   121
A.lwoffii-30            CGAAAGGRAUGCUAAUACCGCAUAC-----------------------GYCCUACGGGRG   208
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     GGAAACCGGGGCUAAUACCCCAUAAAGCCGCCCGCCACUAAGGCGAGGCGGCCAAAGGGG   217
P.taichungensis-F       GGAAACGGTAGCTAATACCGAATAGTTGTTTTCTTC-------------TCCTGAAGGAA   137
P.taichungensis-6       GGAAACGGUAGCUAAUACCGAAUAVUUGUUUUCUUC-------------KCCUGAAGR-R   209
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0
                                                                        84.6%

A.lwoffi-F              AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTG   181
A.lwoffii-30            AAAGCAGGGGAYCUUCGGRCCUUGCGCUAAUAGAUGAGCCUAAGUCRGAUUAGCUAGUUG   268
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     GCCUCUGGGCUCUGCCCAAGCUCCCGCCUGGGGAUGGGCCCGCGGCCCAUCAGGUAGUUG   277
P.taichungensis-F       AACTGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGGGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTG   197
P.taichungensis-6       AACUGGAAAGAYGGAGCAAUCURUCACUUGRGGAUGGGCCUGCGGCGCAUUAGCUAGUUG   269
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0

                                                                96,8%
A.lwoffi-F              GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC   241
A.lwoffii-30            GUGGGGUAAAGGCCUACCAAGGCGACGAUCUGUAGCGGGUCUGAGAGGAUGAUCCGCCAC   328
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     GUGGGGUAACGGCCCACCAAGCCUAUGACGGGUAGCCGGCCUGAGAGGGUGGCCGGCCAC   337
P.taichungensis-F       GTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC   257
P.taichungensis-6       GUGRGGUAACGGCUCACCAAGGCGACGAUGCGUAGCCGACCUGAGAGGGUGAUCGGCCAC   329
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0
                                                                97,8%

A.lwoffi-F              ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA   301
```

```
A.lwoffii-30          ACUGGGACUGAGACACGGCCCAGACUCCURCGGGAGGCAGCAGUGGGGAAUAUUGGACAA   388
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   AGCGGGACUGAGACACGGCCCGCACCCCUACGGGGGGCAGCAGUGGGGAAUCGUGGGCAA   397
P.taichungensis-F     ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA   317
P.taichungensis-6     ACUGGGACUGAGACACGGCCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUAGGGAAUCUUCCGCAA   389
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0

                                                                        80.8%
A.lwoffi-F            TGGGGGGAACCCTGATCCAGC-CATGCCGCGTGTGTGAAGAAG-----------------   343
A.lwoffii-30          UGGGSGRAASCCUGAUCCAGC-CAUGCCGCGUGUGUGAAGAAGGCCUUUUGGUUGUAAAG   447
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   UGGGCGAAAGCCUGACCCCGCGAC-GCCGCGUGGGGGAAGAAGCCCUGCGGGGUGUAAAC   456
P.taichungensis-F     TGGGCGAAAGCCTGACGGAAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAG   377
P.taichungensis-6     UGGGCGAAAGCCUGACGG-AGCAAUGCCGCGUGAGUGAUGAAGGUUUUCGGAUCGUAAAG   448
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0
                                                                        94.9%

A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          CACUUUAAGCGAGGAGGAGGMKMYYBDRRUUAAUACYYWDGRWKMKUGGACGUUACUCGC   507
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   CCCUGUCGGGGGGGACGAAGGGACUGUGGGUUAAUAGCCCACAGUCUUGACGGUACCCCC   516
P.taichungensis-F     CTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGG-AGAGTAACTGCTC-------------------   417
P.taichungensis-6     CUCUGUUGCCAGGGAAGAACGCUYRGG-AGAGUAACUGCUCYYRAGGUGACGGUACCUGA   507
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0

                                          98,0%
A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          AGAAUAAGCACCGGCUAACUCUGUGCCAGCAGCCGCGGUAAUACAGAGGGUGCRAGCGUU   567
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   AGAGGAAGGGACGGCUAACUACGUGCCAGCAGCCGCGGUAAUACGUAGGUCCCGAGCGUU   576
P.taichungensis-F     ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6     GAAGAAAGCCCCGGCUAACUACGUGCCAGCAGCCGCGGUAAUACGUAGGGGGCAAGCGUU   567
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0
                                         100,0%

                                                                        83.3%
A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          AAUCGGAUUUACUGGGCGUAAAGCGYGCGUAGGYGGCYWHUUAAGYCRRAUGUGAAAUCC   627
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   GCGCGAAGUCACUGGGCGUAAAGCGUCCGCAGCCGGUCGGGUAAGCGGGAUGUCAAAGCC   636
P.taichungensis-F     ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6     GUCCGGAAUUAUUGGGCGUAAAGCGCGCGCAGGCGGUCAUUUAAGUCUGGUGUUUAAUCC   627
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0
                                                                       100.0%

A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          CYGAGCUUAACUURGGAAUUGCAUUCRAUACUGGKWRGCUAGAGUAUGGGAGAGGAUGGU   687
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   CACGGCUCAACCGUGGAAUGGCAUCCCGAACUGCCCGACUUGAGGCACGCCCGGGCAGGC   696
P.taichungensis-F     ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6     CGGGGCUCAACCCCGGAUCG-CACUGGAAACUGGRUGACUUGAGUGCAGAAGAGGAGAGU   686
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0

                                                                   96,1%
A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          AGAAUUCCAGGUGUAGCGGUGAAAUGCGUAGAGAUCUGGAGGAAUACCGAUGGCGAAAGG   747
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   GGAAUUCCCGGGGUAGCGGUGAAAUGCGUAGAUCUCGGGAGGAACACCGAAGGGGAAG-C   755
P.taichungensis-F     ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6     GGAAUUCCACGUGUAGCGGUGAAAUGCGUAGAKAUGUGGAGGAACACCAGUGGCGAAG-G   745
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0
                                                                   98,7%

A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          CAGCCAUCUGGCCUAAUACUGACRCUGAGGURCGAAAGCAUGGGGAGSAAACAGGAUUAG   807
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   CAGCCUGCUGGGGCUGUCCUGACGGUCAGGGACGAAAGCCGGGGGAGCGAACCGGAUUAG   815
P.taichungensis-F     ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6     CGACUCUCUGGGCUGUAACUGACGCUGAGGCGCGAAAGCGUGGGGAGCAAACAGGAUUAG   805
P.taichungensis-R'    ------------------------------------------------------------   0

                                 100.0%
A.lwoffi-F            ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30          AUACCCUGGUAGUCCAUGCCGUAAACGAUGUCUACUAGCCGUUGGGG--CCUUUGAGGCU   865
A.lwoffi-R'           ------------------------------------------------------------   0
A.p                   AUACCCGGGUAGUCCCGGCCGUAAACCAUGGG-CGCUAGGGCUUGUCCC-----UUUGGG   869
```

```
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       AUACCCUGGUAGUCCACGCCSGUAAACGAUGARUGCUAGGUGUUAGGGGUUUCGAUACCC   865
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0
                                          95.1%

A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            UUAGUGGCGCAGCUAACGCGAUAAGUAGACCGCCUGGGGAGUACGGUCGCAAGACUAAAA   925
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------   0
A.p                     GCAGGCUCGCAGCUAACGCGUUAAGCGCCCCGCCUGGGGAGUACGGGCGCAAGCCUGAAA   929
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       UUGGUGCCGAAGUUAACACAUUAAGCAYUCCGCCUGGGGAGUACGGUCGCAAGACUGAAW   925
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------   0


                         100,0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            CUCAAAUGAAUUGACGGGGGCCCGCACAAGCGGUGGAGCAUGUGGUUUAAUUCGAUGCAA   985
A.lwoffi-R'             -------------------------CAAGCGGTGGAGCATGCTGGTTTAATTCGATGCAA   35
A.p                     CUCAAAGGAAUUGGCGGGGGCCCGCACAACCGGUGGAGCGUCUGGUUCAAUUCGAUGCUA   989
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       CUCAAAGGAAUUGACGGGGACCCGCACAAGCAGUGGAGUAUGUGGUUUAAUUCGAAGCAA   985
P.taichungensis-R'      ---------------------CCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAA   39
                         98,6%

                                   100.0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            CGCGAAGAACCUUACCUGGUCUUGACAUAGUAAGAACUUUCCAGAGAUGGAUU-------   1038
A.lwoffi-R'             CGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGATT-------   88
A.p                     ACCGAAGAACCUUACCCGGGCUUGACAUGCCGGGGAGACUCCGCGAAAGCGGAGUUGUGG   1049
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       CGCGAAGAACCUUACCAGGUCUUGACAUCCCUCUGACCGGUACAGAGAUGUACC------   1039
P.taichungensis-R'      CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTACAGAGATGTACC------   93
                                   100.0%

                                             100,0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            -GGUGCCUUCGGGAACUUACAUACAGGUGCUGCAUGGCUGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAG   1097
A.lwoffi-R'             -GGTGCCTTCGGGAACTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTTAG   147
A.p                     AAGUCUCUGACUUCCCCCCGGCACAGGUGGUGCAUGGCCGUCGUCAGCUCGUGUCGUGAG   1109
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       --UUUCCUUCGGGACAGAGGAGACAGGUGGUGCAUGGUUGUCGUCASCUCGUGUCGUGAG   1097
P.taichungensis-R'      --TTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG   151
                                              98,6%

                                             97.5%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            AUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCAACCCUUUUCCUUAUUUGSCAGCGGSUUAAGC   1157
A.lwoffi-R'             ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGC   207
A.p                     AUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCAACCCCUGCCCCUAGUUGCUACCCCGAG-AGG   1168
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       AUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCAACCCUUGAUCUUAGUUGCCAGCAYUUC-GGR   1156
P.taichungensis-R'      ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTC-GGA   210
                                            100.0%

                                                   97,5%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            CGGGAACUUUAAGGRUACUGCCAGUGACAAACUGGAGGAAGGCGGGGACGACGUCAAGUC   1217
A.lwoffi-R'             CGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTC   267
A.p                     GGAGCACUCUAGGGGGACCGCCGGCGAUAAGCCGGAGGAAGGGGGGGAUGACGUCAGGUC   1228
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       URGGCACUCUAAGGUGACUGCCGGUGACAAACCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAAAUC   1216
P.taichungensis-R'      TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC   270
                                                   96,2%

                                                                          96.6%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            AUCAUGGCCCUUACGACCAGGGCUACACACGUGCUACAAUGGUCGGUACAAAGGGUUGCU   1277
A.lwoffi-R'             ATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCT   327
A.p                     AGUAUGCCCUUUAUGCCCGGGGCCACACAGGCGCUACAGUGGCCGGGACAAUGGGAAGCG   1288
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       AUCAUGCCCCUUAUGACCUGGGCUACACACGUACUACAAUGGCCGGUACAACGGGCWGYG   1276
P.taichungensis-R'      ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGCAGTG   330
                                                                          95.0%

A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------   343
A.lwoffii-30            ACCMGC--GAKGGAUGCUAAUCUCAAAAAGCCGAUCGUAGUCCGGAUUGGAGUCUGCAAC   1335
A.lwoffi-R'             ACCACGCGAGAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAAC   387
A.p                     ACCCCGCAAGGGGGAGCUAAUCCCAGAAACCCGGUCAUGGUGCGGAUUGGGGGCUGAAAC   1348
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------   417
P.taichungensis-6       AARCCGCGAGGUGGARCKAAUCCUAAAAAGCCGGUCUCAGUUCGGAUUGYAGGCUGCAAC   1336
```

```
P.taichungensis-R'      AAACCGCGAGGTGGAACGAATCCTAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAAC         390

                                100,0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------         343
A.lwoffii-30            UCGACUCCAUGAAGUCGGAAUCGCUAGUAAUCGCGGAUCAGAAUGCCGCGGUGAA-UACG         1394
A.lwoffi-R'             TCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAA-TACG         446
A.p                     UCGCCCCCAUGAAGCCGGAAUCGGUAGUAACGGGGUAUCAGCGAUGUCCCCGUGAAUACG         1408
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------         417
P.taichungensis-6       UCGCCURCAUGAAGUCGGAAUUGCUAGUAAUCGCGGAUCAGCAUGCCGCGGUGAAUACGU         1396
P.taichungensis-R'      TCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT         450
                               99,2%

                                                                          95.0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------         343
A.lwoffii-30            UUCCCGGGCCUUGUACACACCGCCCGUCACACCAUGGGARUUUGUUGCACCAGAAGUAGG         1454
A.lwoffi-R'             TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTGCACCAGAAGTAGG         506
A.p                     UUCUCGGGCCUUGCACACACCGCCCGUCACGCCACGGAAGUCGGUCCGGCCGGAAGUCCC         1468
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------         417
P.taichungensis-6       UCCCCGGGUCUUGUACACACCGCCCGUCACACCACGAGAGUUUAUAACACCYGAAGUCGG         1456
P.taichungensis-R'      TCC-CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTATAACACCCGAAGTCGG         509
                                                                          98.3%

                                                     86.0%
A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------         343
A.lwoffii-30            UAGUCUAACCKYARGGGRGGCGC----------UUACCACGGUGUGGCMGGAUGASUGRG         1504
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------         506
A.p                     CGAGCUAACCGGCCCUUUUUGGGCCGGGGGCAGGGGCCGAUGGCCGGGCCGGCGACUGGG         1528
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------         417
P.taichungensis-6       UGGGGUAACCGCAAGGAGCCASCC-----------GCCGAAGGUGGGAUAGAUGAUKGGG         1505
P.taichungensis-R'      TGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCC-----------GCCGAAG------------------         540
                                                     81,0%

A.lwoffi-F              ------------------------------------------------------------         343
A.lwoffii-30            GUGAAGUCGUAACAAGKUARCCRUAGGGGRACCUGCGGYUGGAYMACCUCCUUAUACUAU         1564
A.lwoffi-R'             ------------------------------------------------------------         506
A.p                     GCGAAGUCGUAACAAGGUAGCCGUAGGGGAACCUGC-------------------------         1564
P.taichungensis-F       ------------------------------------------------------------         417
P.taichungensis-6       GWGAAGUCGUAMMRRGGKRRCCGWAWMGGRMGRUSCGGCUGGAUCACCUCCUUUCUAUGG         1565
P.taichungensis-R'      ------------------------------------------------------------         540

A.lwoffi-F              ---  343
A.lwoffii-30            U--  1565
A.lwoffi-R'             ---  506
A.p                     ---  1564
P.taichungensis-F       ---  417
P.taichungensis-6       AGA  1568
P.taichungensis-R'      ---  540
```