

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

на правах рукописи

ЗАДОРИНА
ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

Биоразнообразие diaзотрофов почв с различной антропогенной нагрузкой

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Центре “Биоинженерия” РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Булыгина Евгения Станиславовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Горленко Владимир Михайлович

кандидат биологических наук
Манучарова Наталия Александровна

Ведущая организация: РГАУ Московская сельскохозяйственная академия
(МСХА) имени К.А. Тимирязева

Защита состоится 23 декабря 2008 года в 15 ч 30 мин на заседании Диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени В.М. Ломоносова.

Автореферат разослан “ ____ ” ноября 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.Ф. Пискункова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Азот – элемент, который, как никакой другой лимитирует ресурсы питательных веществ в экосистемах. Биологическая фиксация атмосферного азота представляет собой уникальный процесс, осуществление которого в различных биогеоценозах происходит исключительно за счет метаболической активности прокариот. При этом особую роль играет этот процесс в экстремальных местах обитания, а также в агросистемах, обеспечивая значительную часть азотного питания сельскохозяйственных культур даже в условиях применения азотных удобрений.

Несмотря на огромный интерес исследователей к изучению различных аспектов азотфиксации, до сих пор малоизученными остаются вопросы, связанные с количественной оценкой, пространственным распределением diaзотрофов по экосистемам, видовым составом азотфиксирующих прокариот. С появлением современных молекулярно-биологических подходов возможности изучения почвенных diaзотрофных сообществ значительно расширились, тем не менее высокие финансовые затраты, часто сопутствующие таким исследованиям, и связанная с этим необходимость использования приемов, упрощающих анализ, все еще не позволяют более полно проводить такие работы. Так, одним из самых мощных молекулярно-биологических методов оценки разнообразия микробных сообществ является анализ библиотек клонов функциональных генов, в частности генов нитрогеназного комплекса, к которым относится ген *nifH*. Однако при использовании этого метода в большинстве работ применяется либо анализ заведомо небольших выборок традиционным объемом в 100 клонов, либо стратегия скрининга клонов, основанная на рестрикции и других приемах. Такие упрощения далеко не всегда отражают реальное разнообразие микроорганизмов *in situ*, особенно при анализе сложных микробных сообществ. В этой связи представляется весьма ценным проведение исследований, в которых метод клонирования генов нитрогеназного комплекса использовался бы без упрощающих анализ приемов. В настоящее время такие работы практически отсутствуют.

Поскольку изучение биоразнообразия азотфиксирующих микроорганизмов в различных природных экосистемах относится к важнейшим задачам микробной экологии, то проведение работ по оценке внутренней структуры diaзотрофных сообществ и выявлению доминирующих микробных популяций азотфиксаторов в почвах с различной антропогенной нагрузкой является очень актуальным. Несомненно, такие исследования представляют ключевое звено на пути к пониманию основных закономерностей функционирования процесса азотфиксации.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось проведение оценки биоразнообразия почвенных diaзотрофов методом клонирования фрагментов гена *nifH* на примере

естественной экосистемы торфяного болота и ризосфер биотехнологических (БР) и контрольных растений (КР) картофеля.

Задачи исследования состояли в следующем:

- 1) Оценить биоразнообразие diaзотрофов в образце торфяной почвы естественной экосистемы болота “Сосвятское” с помощью метода клонирования гена *nifH*.
- 2) Оценить биоразнообразие diaзотрофов в образцах почв, отобранных из ризосфер БР и КР картофеля, с помощью анализа библиотек клонов фрагментов гена *nifH*.
- 3) Сравнить структуры diaзотрофных сообществ торфяной почвы и сельскохозяйственной почвы.

Научная новизна работы. Впервые исследовано биоразнообразие diaзотрофов в торфяной почве с помощью непосредственного анализа библиотеки фрагментов гена *nifH* без использования процедур предварительного скрининга клонов. Установлено, что видовое богатство азотфиксирующих микроорганизмов в торфе было существенно выше, чем считалось раньше; и для покрытия всего разнообразия diaзотрофов в этой экосистеме необходим размер библиотеки, превышающий традиционно используемое количество в 100 клонов. Впервые исследована структура diaзотрофных сообществ почв, отобранных из ризосфер БР и КР картофеля, с помощью анализа библиотеки клонов фрагментов гена *nifH*. Показано, что разнообразие diaзотрофов в ризосфере картофеля было значительно ниже по сравнению с торфяной почвой. Достоверных различий в структурах микробных сообществ почв, отобранных из ризосфер БР и КР картофеля, выявлено не было.

Практическая значимость работы. На примере модельной системы diaзотрофного сообщества торфяной почвы показано, что традиционного объема выборки в 100 клонов не всегда достаточно для исследования разнообразия diaзотрофов в экосистеме. На примере diaзотрофного сообщества агроэкосистемы установлено, что для получения более полной информации о видовом составе микробного сообщества необходим анализ нескольких библиотек. Полученные нами данные существенно расширяют представление о таксономическом разнообразии азотфиксирующих микроорганизмов в кислой торфяной и пахотной почвах. Кроме того, результаты, полученные в ходе оценки биоразнообразия азотфиксаторов в ризосферах БР и КР, в целом расширяют представления о влиянии трансгенных растений на почвенные микробные сообщества и могут использоваться в качестве необходимой базы для сравнения с результатами последующих исследований, направленных на дополнение, проверку и уточнение полученных в наших исследованиях данных.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 11 Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2007),

Международной научно-практической конференции “Биотехнология: вода и пищевые продукты” (Москва, 2008), XLVI Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2008) и на IV семинаре “Использование нанотехнологий в агропромышленном комплексе” (Москва, 2008).

Публикации. Основные материалы, обсуждаемые в диссертации, опубликованы в 2 статьях и 4 тезисах конференций. 2 статьи приняты к печати.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 135 страницах машинописного текста и включают 28 рисунков и 10 таблиц. Диссертация состоит из разделов: “Введение”, “Литературный обзор”, “Экспериментальная часть” (включающая главы “Материалы и методы исследования”, “Результаты и обсуждения”), “Выводы” и “Список литературы”, который содержит 26 отечественных и 211 иностранных наименования.

Место проведения работы и сотрудничество. Работа проводилась в Центре “Биоинженерия” РАН. Образцы почвы ризосфер БР и КР картофеля, а также их физико-химическая характеристика, были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории грибных болезней картофеля и овощных культур Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии РАСХН (ВНИИФ). Образцы кислой торфяной почвы сфагнового болота п. Сосвятское (Тверская обл., Россия), а также их физико-химическая характеристика, были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории классификации и хранения уникальных микроорганизмов Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН (ИНМИ). Определение последовательностей нуклеиновых кислот фрагментов гена *nifH* было выполнено в сотрудничестве с к.б.н. Колгановой Т.В., разработка специфических праймерных систем – при содействии к.б.н. Булыгиной Е.С. Автор выражает глубокую благодарность всем упомянутым участникам данной работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. Рендомизированный образец кислой торфяной почвы был отобран в ноябре 2005 г. из центральной части олиготрофного болота “Сосвятское” (Западно-Двинская полевая станция Института лесоведения РАН; Тверская обл.), покрытого растительным сообществом, состоящим из *Sphagnum* sp., *Oxycoccus quadripetalus* и *Carex rostrata*. Образцы отбирали асептически в виде блоков объемом 200 см³ с глубины 10-20 см, показавшей наибольшую нитрогеназную активность. Величина рН почвенных образцов составляла 3.9, влажность – около 92%.

В работе также были использованы образцы почв, отобранные из ризосферы трех контрольных и трех биотехнологических сортов картофеля (“Луговской”, “Чародей”, “Голубизна”), несущих ген тауматина (*TauII*), придающего устойчивость к основным грибным

болезням. Физико-химическая характеристика образцов почв представлена в таблице 1. Схема расположения контрольных и опытных делянок на экспериментальном поле представлена на рисунке 1. Распределение делянок на поле носило случайный характер. Размер каждой делянки составлял 2 м². Выращивание картофеля проводилось на сертифицированном МВКГИД РФ полевом участке ВНИИ фитопатологии. Семенные клубни трансгенных линий и контролей были предоставлены Центром “Биоинженерия” РАН. Дата посадки картофеля – 23 мая, уборка – 12 сентября. Агротехнические мероприятия по уходу за опытными растениями включали: зяблевую вспашку, весновспашку, предпосадочную нарезку борозд, внесение органоминеральных удобрений в дозе 200 кг/га, прополку, окучивание и полив растений. От колорадского жука растения в период вегетации дважды обрабатывали инсектицидами “Актара” (0,06 кг/га) и “Конфидор”. Количество обработок определялось сложившимися метеорологическими условиями, благоприятными для развития вредителя. Расход рабочей жидкости – из расчета 400 л/га (данные предоставлены ВНИИ фитопатологии РАСХН, г. Большие Вяземы, Московская область).

Выделение ДНК. Для получения препаратов ДНК из почвенных образцов использовали разработанный нами метод (Запороженко и др., 2006).

ПЦР. Для амплификации фрагментов гена *nifH* были использованы разработанная в нашей лаборатории ранее система праймеров (**F1** и **R6**) и протокол проведения реакции (Марусина и др., 2001). Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК (626 п.н.) с целью последующего проведения DGGE, осуществляли с использованием слегка модифицированных нами праймеров (Muzyer et al., 1993, 1998a):

341F 5'– CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC CCT CCT ACG GGA GGC AGC AG – 3'

907R 5'– CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT – 3'

M = C:A, R = G:A, везде 1:1

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: буфер для полимеразы (67 мМ Трис-НСl, рН 8.8; 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 1.5 мМ MgCl₂), по 5 нмоль каждого из dNTP, по 12.5 пмоль прямого и обратного праймеров, около 25 нг ДНК-матрицы и 1.5 ед. ДНК-полимеразы *SmartTaq* (5 ед/мкл, Диалат ЛТД, Россия). Для проведения ПЦР использовали температурно-временной профиль, описанный Шефером и Мюйзером (Schafar and Muzyer, 2001) для соответствующей группы праймеров. После проведения реакции амплификации полученные ПЦР-фрагменты разделяли в акриламидном геле в условиях градиента денатурирующих агентов (DGGE).

Таблица 1. Физико-химическая характеристика почв*

Название материала	Дата отбора почвенного образца	Глубина отбора образцов почв; см	Стадия развития растения на момент отбора почвенной пробы	Количество растений картофеля на делянке; шт.	Тип почвы	Содержание, %		pH почвы	Влажность почвы; %
						песок	глина		
1. сорт “Луговской”, контроль I	08.09.06 г.	5 – 7	Полное созревание (за неделю до уборки)	10	Дерново-подзолистая, средне-суглинистая	21	48	6,4	27
2. сорт “Луговской”, трансгенные растения I № 15, 677309	08.09.06 г.	5 – 7		10		21	48	6,4	27
3. сорт “Голубизна”, контроль I	08.09.06 г.	5 – 7		10		21	48	6,4	27
4. сорт “Голубизна”, трансгенные растения I № 5, 135315	08.09.06 г.	5 – 7		10		21	48	6,4	27
5. сорт “Чародей”, контроль I	08.09.06 г.	5 – 7		10		21	48	6,4	27
6. сорт “Чародей”, трансгенные растения I № 12 (1), 103306	08.09.06 г.	5 – 7		10		21	48	6,4	27

* - Данные предоставлены ВНИИФ РАСХН

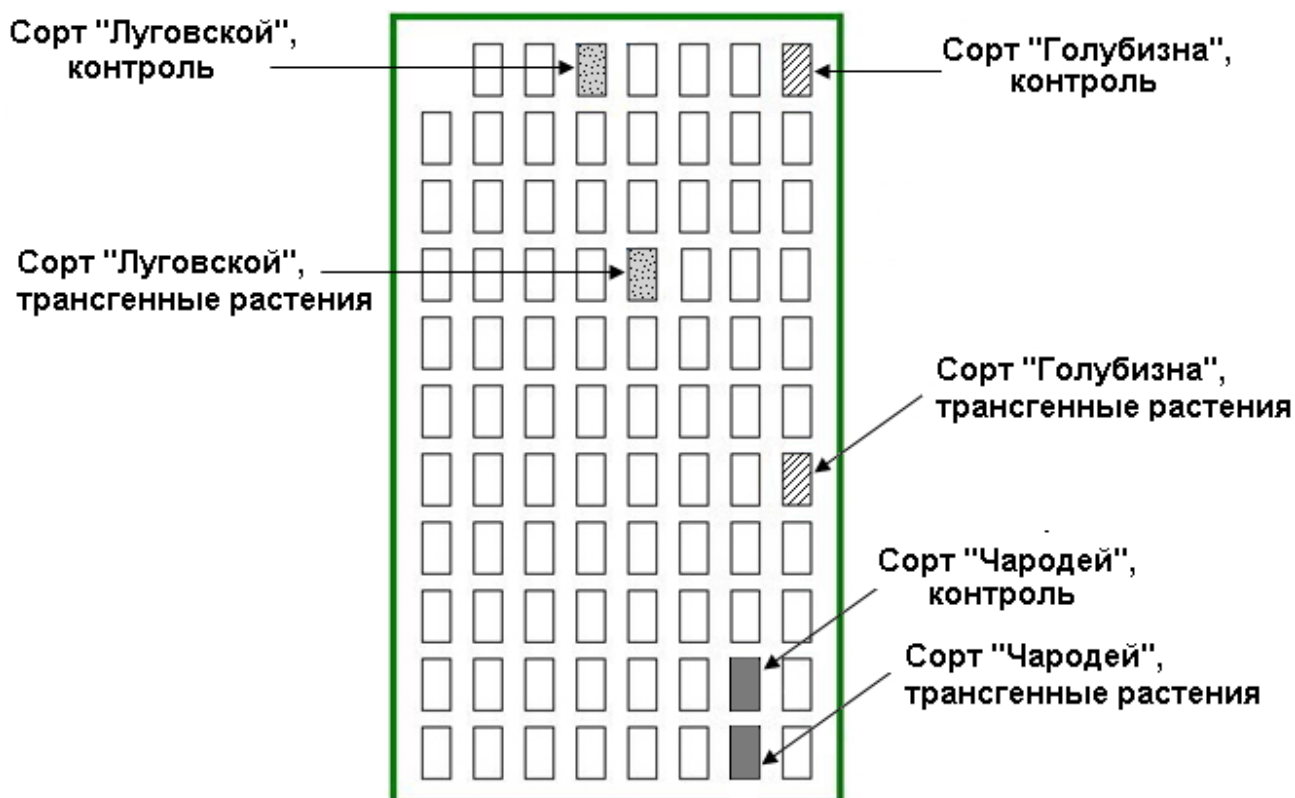


Рис. 1. Схема расположения контрольных и опытных делянок на экспериментальном поле (по данным, предоставленным ВНИИФ РАСХН).

Очистка ПЦР-фрагментов. Продукты ПЦР очищали от посторонних примесей при помощи электрофореза в 0.8% легкоплавкой агарозе с применением набора реактивов “Wizard PCRPreps” (Promega, США).

Клонирование ПЦР-фрагментов. Выделенные ПЦР-фрагменты клонировали в компетентных клетках *Escherichia coli* DH10 β с использованием наборов реактивов “pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems” (Promega, США). Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с помощью набора “Wizard MiniPrep” (Promega, США).

Секвенирование. Секвенирование проводили с использованием универсального плазмидного праймера SP6 и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems, США).

Анализ полученных последовательностей. Предварительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *nifH* проводили с помощью программного пакета BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Транслирование нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Редактирование и выравнивание последовательностей проводили с помощью пакета программ

BioEdit [<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]. Нуклеотидные последовательности, сходство между которыми было больше 95%, объединяли в одну группу (сиквенсный тип). Филогенетические деревья были построены на основании транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов гена *nifH* с помощью алгоритма “neighbor-joining”, реализованного в пакете программ TREECONW (van de Peer and Wachter, 1994).

Статистическая оценка достаточности размера библиотеки клонов. Для достоверного анализа структуры диазотрофных сообществ достаточность размера библиотеки клонов оценивали с помощью построения кривых зависимости математического ожидания количества сиквенсных типов в случайной выборке из библиотеки от размера выборки. Расчет проводили с помощью программного обеспечения Analytic Rarefaction (<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>).

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез. ПЦР-фрагменты разделяли в 6%-ном полиакриламидном геле (отношение содержания акриламида к бис-акриlamиду 37,5:1) в денатурирующем градиенте 40-65% (100%-ный денатурант содержал 7 М мочевины и 40%-ный формамид), в однократном трис-ацетатном буфере в течение 17,5 ч при 60°C и напряжении 100 В. Окрашенный бромистым этидием гель документировали с помощью системы BioDoc Analyze II (Biometra, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка биоразнообразия диазотрофов в образце торфяной почвы естественной экосистемы верхового болота

Интерес к изучению микробных сообществ торфяных почв болотных экосистем обусловлен с одной стороны их значительной экологической ролью в биосфере, в частности, в глобальных геохимических циклах таких биогенных элементов, как углерод и азот; с другой стороны – возрастающим значением торфа для нужд сельского хозяйства. В настоящее время совсем немного известно о диазотрофных сообществах таких биогеоценозов, между тем именно этой группе прокариот принадлежит огромное значение в обеспечении растений и микроорганизмов доступными формами азота, который как никакой другой элемент лимитирует ресурсы питательных веществ в таких экстремальных экосистемах. Поскольку работ, посвященных изучению азотфиксации в торфяных почвах единицы (Дорошенко и др., 2007), и в основном они основаны на использовании традиционных микробиологических методов, в наших исследованиях мы применили один из самых чувствительных и информативных методов молекулярной биологии – анализ библиотеки фрагментов гена *nifH*.

1.1. Анализ библиотек клонов. Для проведения молекулярного анализа состава diaзотрофного сообщества в образцах кислой торфяной почвы сфагнового торфяного болота (п. Сосвятское, Тверская область) была использована суммарная ДНК, выделенная из почв, отобранных с глубины 10-20 см, показавшей наибольшую нитрогеназную активность. Первоначально нами была создана и проанализирована библиотека традиционным объемом в 100 клонов, содержащих вставку фрагментов гена *nifH* нужной длины. Данный размер выборки используется в большинстве исследований по изучению разнообразия микробных сообществ различных экосистем (Stackebrandt et al., 1999). Однако насколько адекватно такое количество клонов отражает полное разнообразие микроорганизмов в той или иной экосистеме – это один из сложных вопросов молекулярной экологии. В результате проведенного анализа первой библиотеки нами было выявлено 37 сиквенсных типов diaзотрофов в анализируемом образце торфяной почвы. Данные сиквенсные типы проявили сходство с представителями различных групп микроорганизмов, включая Alphaproteobacteria (17 сиквенсных типов), Gammaproteobacteria (8 типов) и Deltaproteobacteria (4 типа), Opitutae (1 тип), Chlorobea/Clostridia (5 типов), а также Bacilli (2 типа). Выявленное нами количество сиквенсных типов свидетельствовало о значительном видовом богатстве азотфиксирующих микроорганизмов в торфяной почве, в противовес данным, имевшимся ранее (Кравченко и Дорошенко, 2003; Слободова, 2006). Кроме того, было очевидно, что традиционного объема выборки было недостаточно для полного охвата всего разнообразия diaзотрофов в этой экосистеме. Поэтому, на втором этапе нашего эксперимента мы расширили первую библиотеку еще на 100 клонов. В результате такого расширения нами было обнаружено 34 сиквенсных типа diaзотрофов, причем 19 из них совпали с результатами анализа первой библиотеки, а 15 были новыми и по результатам Blast-анализа были отнесены к представителям таких филогенетических групп как Alphaproteobacteria (6 сиквенсных типов), Betaproteobacteria (1 тип), Gammaproteobacteria (2 типа) и Deltaproteobacteria (1 тип), Opitutae (1 тип), Chlorobea/Clostridia (3 типа), а также Methanomicrobia (1 тип). В целом, анализ 200 клонов позволил выявить 52 сиквенсных типа diaзотрофов в образце торфяной почвы (рис. 2); причем каждый из них был представлен небольшим числом клонов. Таким образом, в анализируемой библиотеке не наблюдалось доминирования какого-либо сиквенсного типа.

Основную долю diaзотрофного сообщества в анализируемом нами образце торфяной почвы составляли микроорганизмы, относящиеся к классу Alphaproteobacteria (около 57% клонов из всей библиотеки). Доминирование бактерий данного класса также отмечалось ранее при изучении кислого сфагнового болота Томской области с помощью анализа рибосомальных генов (Dedysh et al., 2006).

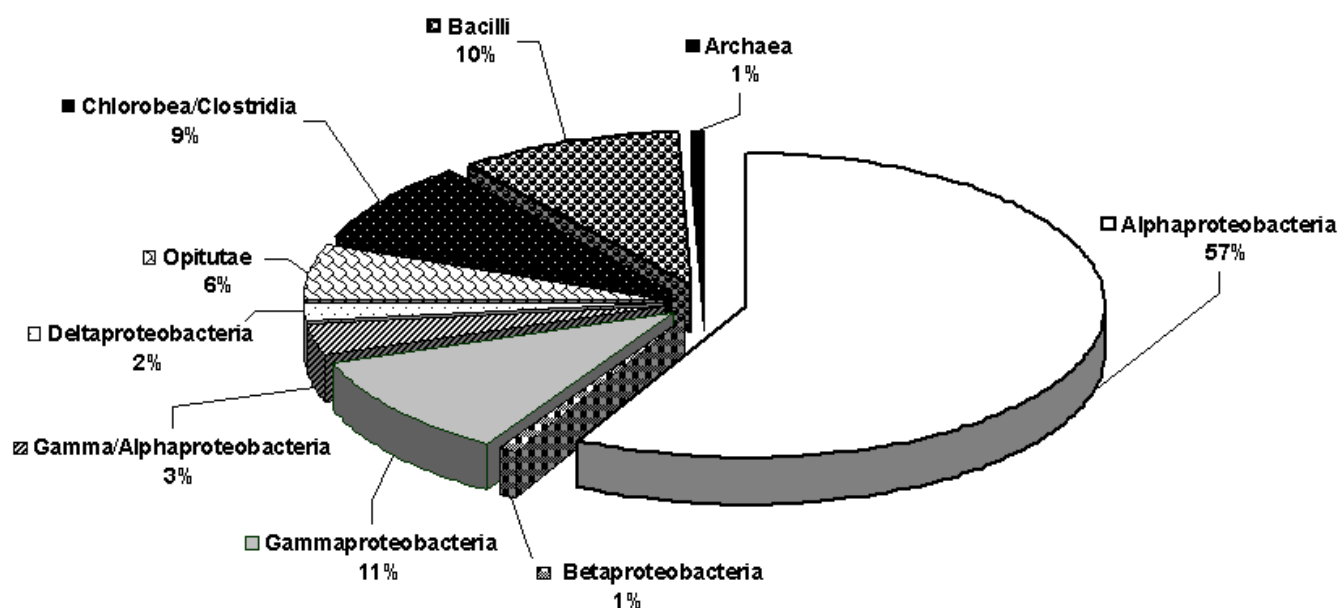


Рис. 2. Соотношение филогенетических групп diaзотрофов, основанное на количестве клонов, выявленных в образце торфяной почвы верхового болота “Сосвятское”.

Таксономическая принадлежность некоторых выявленных последовательностей, близких к Alphaproteobacteria, была нами определена на уровне рода. Так, аминокислотные последовательности фрагментов гена *nifH* двух сиквенсных типов diaзотрофов оказались наиболее близкими к представителям бактерий рода *Methylocystis* (уровень идентичности аминокислотных последовательностей – 97-98%). Наличие в торфяной почве верхового болота микроорганизмов, близких к представителям метанотрофов с сериновым циклом ассимиляции одноуглеродных соединений, не раз отмечалось в других работах (Dedysh et al., 2006). Более того, присутствие азотфиксирующих метанотрофных бактерий II типа (*Mcs. echinoides*, *Mcs. minimus*) было установлено ранее в метанооксиляющих накопительных культурах (Slobodova et al., 2006), полученных из образцов почв того же самого места болота “Сосвятское”. Три сиквенсных типа проявили практически одинаковый уровень идентичности с последовательностями некоторых представителей ризобий (95-96%) и метанотрофов (95-97%), поэтому провести их более точную идентификацию не представилось возможным. Пять сиквенсных типов были близкими с некоторыми представителями ризобий (идентичность – 95-94%), фототрофных пурпурных несерных бактерий порядка Rhodospirillales (95-94%) и факультативно анаэробных бактерий порядка Sphingomonadales (95%). Образование устойчивых ассоциаций некоторых представителей порядка Rhodospirillales с метанотрофными бактериями в торфяной почве болота “Сосвятское” было продемонстрировано ранее нашими коллегами (Дорошенко и др., 2006), которые выделили в чистую культуру и описали новые штаммы *Azospirillum lipoferum*. Обнаруженные в нашем исследовании представители, видимо, являются еще неописанными микроорганизмами,

достаточно близкими к роду *Azospirillum*, а также к некоторым представителям ризобий и сфингобактерий.

Одиннадцать сиквенсных типов, выявленных нами в торфяной почве, обнаружили наибольшее сходство с представителями порядка Rhizobiales (идентичность 95-98%). Более точная идентификация этих микроорганизмов была невозможна вследствие практически одинакового уровня сходства последовательностей данных сиквенсных типов с последовательностями микроорганизмов, относящихся к родам *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Xanthobacter*. Наличие представителей ризобий в торфе не вызывает удивления, поскольку не раз отмечалось, что некоторые культуры данных бактерий могут быть устойчивы к кислой среде (Емцев и Мишустин, 2006).

Два сиквенсных типа были отнесены к представителям родов *Methylocapsa* (98%) и *Beijerinckia* (98%). Микроорганизмы этих двух родов близки как по уровню гомологии последовательностей 16S рНК (96.2%) (Dedysh et al., 2002), так и по уровню идентичности аминокислотных последовательностей гена *nifH*. Аэробные бактерии рода *Beijerinckia* ранее уже детектировались в заболоченных территориях с помощью традиционных микробиологических методов (Головченко и др., 1993). К тому же, исходно бактерии этого рода были выделены из кислых тропических почв Малайзии (Емцев и Мишустин, 2006). Что касается *Methylocapsa*, то представители этого рода, способные расти в кислых условиях среды, исходно были выделены из верхового болота Томской области (Dedysh et al., 2002). Поэтому выявленные в наших исследованиях микроорганизмы, близкие к представителям вышеописанных родов, не вызывают удивления.

Для одного сиквенсного типа удалось определить его принадлежность к представителям Betaproteobacteria. Тот факт, что мы не смогли провести точную идентификацию многих клонов, вероятно, свидетельствует о том, что в исследуемом микробном сообществе кислой торфяной почвы присутствуют различные виды до сих пор не описанных бактерий. С другой стороны, также возможно, что часть анализируемых клонов относится к известным видам микроорганизмов, последовательности фрагментов гена *nifH* которых пока еще не представлены в банке данных.

Из представителей класса Gammaproteobacteria нами были выявлены клоны, которые с высокой степенью достоверности можно отнести к *Methylobacter bovis* (идентичность – 100%). Присутствие в торфяной почве представителей метанотрофных бактерий I типа, близких к этому роду отмечалось и в других работах (Morris et al., 2002), однако нам не встречались данные по детекции обнаруженного нами вида в почвах верховых болот. Последовательности трех сиквенсных типов проявили сходство как с представителями класса Gammaproteobacteria, так и Alphaproteobacteria. Остальные 6 сиквенсных типов оказались наиболее близки с представителями

различных родов из Gammaproteobacteria, однако низкий уровень идентичности (85-89%) не позволил провести более точную идентификацию. Наличие большого количества неидентифицируемых микроорганизмов, входящих в этот класс, отмечалась ранее и в других работах (Слободова, 2006).

Аналогично было невозможно достаточно точно идентифицировать большинство клонов, которые по сходству аминокислотных последовательностей были отнесены к классам Deltaproteobacteria, Opitutae, Chlorobea/Clostridia и Bacilli. Из представителей Deltaproteobacteria нам удалось точно выявить лишь один сиквенсный тип, близкий к роду *Syntrophobacter* (идентичность – 93%). Два других сиквенсных типа проявили низкий уровень идентичности (85-88%) с представителями родов *Desulfovibrio/Syntrophobacter*. Четыре сиквенсных типа оказались близкими с представителями класса Opitutae, однако более точная их идентификация также не представилась возможной.

Восемь сиквенсных типов проявили низкий уровень сходства (80-87%) с представителями родов *Prosthecochloris*, *Pelodictyon*, *Chlorobium* и *Clostridium*. Отсутствие близкого родства сиквенсных типов с идентифицированными организмами класса Chlorobea также отмечалось в другой работе (Слободова, 2006). В отношении класса Bacilli следует отметить, что некоторые микроорганизмы, обнаруженные нами, также ранее детектировались в кислых почвах другими исследователями. Так, представители факультативно анаэробных азотфиксирующих бактерий рода *Paenibacillus* были обнаружены в торфяном болоте Западной Сибири (Popova, 1961). Что касается выявленных в нашем исследовании представителей, близких к роду *Methanosarcina* (92-93% сходства), то согласно данным литературы археи, близкие к данному виду детектировались в торфяной почве болот Великобритании (Nercessian et al., 1999).

Таким образом, в ходе нашего исследования по оценке биоразнообразия diaзотрофного сообщества торфяной почвы верхового болота нами было выявлено существенное видовое богатство азотфиксирующих микроорганизмов, большинство последовательностей фрагментов гена *nifH* которых еще не представлены в банке данных и возможно принадлежат пока еще неописанным прокариотам.

1.2. Статистический анализ. Проведенная нами статистическая оценка размера библиотеки клонов для достоверного анализа структуры diaзотрофного сообщества показала, что для полного охвата разнообразия diaзотрофов в исследуемом образце торфа не было достаточно размера выборки даже почти в 200 клонов (рис. 3). Кроме того, в результате анализа экстраполяции кривой нами было отмечено, что для полноценного покрытия всего биоразнообразия азотфиксирующих микроорганизмов в исследуемой экосистеме необходимо использование как минимум 500 клонов.

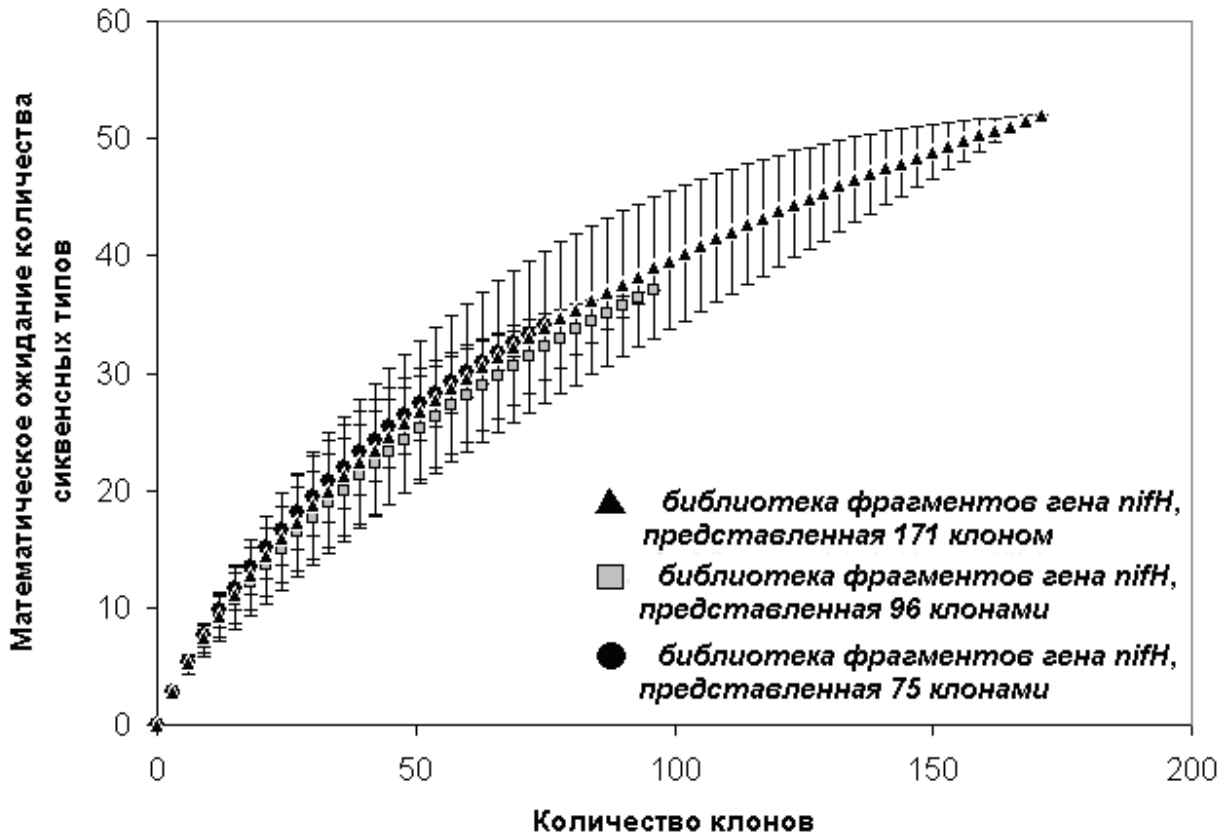


Рис. 3. Кривые зависимости количества сиквенсных типов diaзотрофов в случайной выборке из библиотеки от размера этой выборки (графики построены с учетом химерных последовательностей).

1.3. Анализ diaзотрофного сообщества с помощью специфичных праймеров. Для дополнительного подтверждения недостаточности размера нашей библиотеки для анализа биоразнообразия diaзотрофов в экосистеме торфяного болота, мы провели исследование на основе стратегии применения группоспецифичных праймерных систем.

Ранее нашими коллегами из ИНМИ с помощью иммунофлуоресцентного анализа было показано присутствие в метанотрофных накопительных культурах, выделенных из болота “Сосвятское”, представителей рода *Methylobacter* (Слободова и др., 2006). Следует отметить, что при исследовании образцов почв, отобранных из того же самого места верхового болота, мы не смогли обнаружить данного представителя метанотрофов I типа. Поэтому для выявления этих микроорганизмов в образце тотальной ДНК анализируемого нами сообщества мы использовали специфичную для этой группы бактерий праймерную систему (рис. 4). Анализ клонированных фрагментов, полученных с помощью данных праймеров, выявил 2 сиквенсных типа, один из которых проявил 100%-ную идентичность с *Methylobacter bovis*, а другой – с *Methylobacter methanica*.

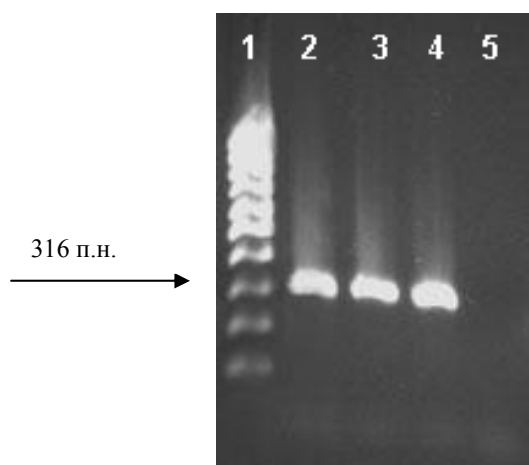


Рис. 4. Амплификация фрагментов гена *nifH* с использованием праймеров, специфичных для метанотрофов I типа, на препарате ДНК, выделенной из торфа. Стрелкой указан целевой фрагмент. Цифрами обозначены: 1 – маркер молекулярной массы ДНК (100 bp); 2, 3 – суммарная ДНК, выделенная из торфа; 4 – *Methylobacter vinelandii* (положительный контроль); 5 – контроль в отсутствии ДНК-матрицы.

Подобная работа была проделана и для бактерий класса Chloroflexi, наличие которых было показано в почве болота “Сосвятское” ранее (Слободова, 2006), но в ходе нашего исследования не было обнаружено представителей, близких к роду *Oscillochloris*. При использовании праймеров, специфичных для данных микроорганизмов, нами также было показано их наличие в торфяной почве (рис. 5).

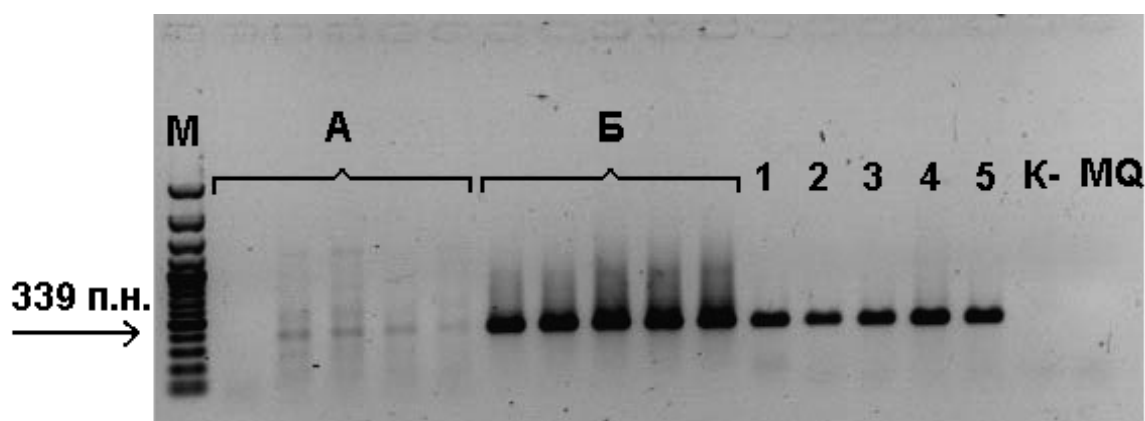


Рис. 5. Амплификация фрагментов гена *nifH* с использованием праймеров, специфичных для рода *Oscillochloris* на ДНК, выделенной из торфа. А – в качестве матрицы использована суммарная ДНК, выделенная из торфа (5 повторностей); Б – в качестве матрицы использованы ПЦР-фрагменты гена *nifH*, полученные с помощью универсальных праймеров F1-R6.

Стрелкой указан целевой фрагмент. М – маркер молекулярной массы ДНК. К- – *Bacillus licheniformis* (отрицательный контроль). MQ – контроль в отсутствии ДНК-матрицы. Цифрами обозначены положительные контроли: 1 – ДНК *Oscillochloris* sp. A19; 2 – ДНК *Oscillochloris trichoides* DG6; 3 – ДНК *Oscillochloris* sp. KR; 4 – ДНК *Oscillochloris* sp. R; 5 – ДНК *Oscillochloris* sp. C6.

Таким образом, проведенный анализ подтвердил, что для полноценного изучения биоразнообразия diaзотрофного сообщества торфяной почвы использование размера библиотеки даже в два раза превышающей традиционный объем выборки в 100 клонов недостаточно.

2. Оценка биоразнообразия diaзотрофов в образцах почв, отобранных из ризосфер контрольных и биотехнологических растений картофеля

В исследованиях, касающихся изучения биоразнообразия микробных сообществ с помощью клонирования функциональных генов помимо вопроса репрезентативности клональных выборок, все больший интерес приобретает проблема неопределенности количества библиотек для более точной интерпретации получаемых данных. Поскольку торфяная почва, в силу выявленного большого разнообразия, оказалась неудобным модельным объектом, вопрос о том насколько адекватно одна библиотека отражает разнообразие diaзотрофов в определенной экосистеме, мы попытались решить, исследовав diaзотрофное сообщество экосистемы, подвергнутой антропогенному воздействию.

Интерес к изучению агросистем обусловлен достаточной их бедностью микробным разнообразием, и в тоже время малой степенью изученности структур diaзотрофных сообществ сельскохозяйственных почв с помощью современных молекулярно-биологических методов. Поскольку биологическая фиксация азота играет основополагающую роль в поддержании плодородия почв и урожайности растений, а знание биоразнообразия азотфиксаторов в таких системах все еще ограничено, для проведения наших исследований была выбрана агросистема картофельного поля, на котором выращивались БР и КР. В связи с тем, что вопрос биобезопасности БР до сих пор является актуальным, дополнительной задачей перед нами стояло проведение оценки возможного влияния трансгенного картофеля, устойчивого к фитофторозу, на структуру diaзотрофных сообществ почвы. В нашей работе основной упор был сделан на определение последовательностей фрагментов гена *nifH* абсолютно всех включенных в анализ клонов, а не отдельных представителей, определенных в результате предварительного скрининга клонов. В исследованиях по оценке биоразнообразия diaзотрофов пахотной почвы такой анализ был проделан впервые.

2.1. Анализ на основе денатурирующего градиентного гель-электрофореза. Для нашего эксперимента были использованы образцы почв, отобранные из ризосфер трех контрольных и трех трансгенных сортов картофеля (“Чародей”, “Голубизна”, “Луговской”), несущих ген тауматина (*TauII*), придающего устойчивость к грибным болезням.

Первая часть наших экспериментов была связана с проведением предварительного анализа сложности микробных сообществ исследуемой агросистемы с помощью денатурирующего

градиентного гель-электрофореза (DGGE) суммарного амплификата фрагментов гена 16S рРНК. Этот метод позволяет быстро проводить качественную оценку, как сложности анализируемых сообществ, так и различий между их доминантными составляющими (Novinscak et al., 2007).

Для всех экспериментальных образцов почв нами были получены профили DGGE, каждый из которых содержал как минимум 20 дискретных полос (рис. 4).

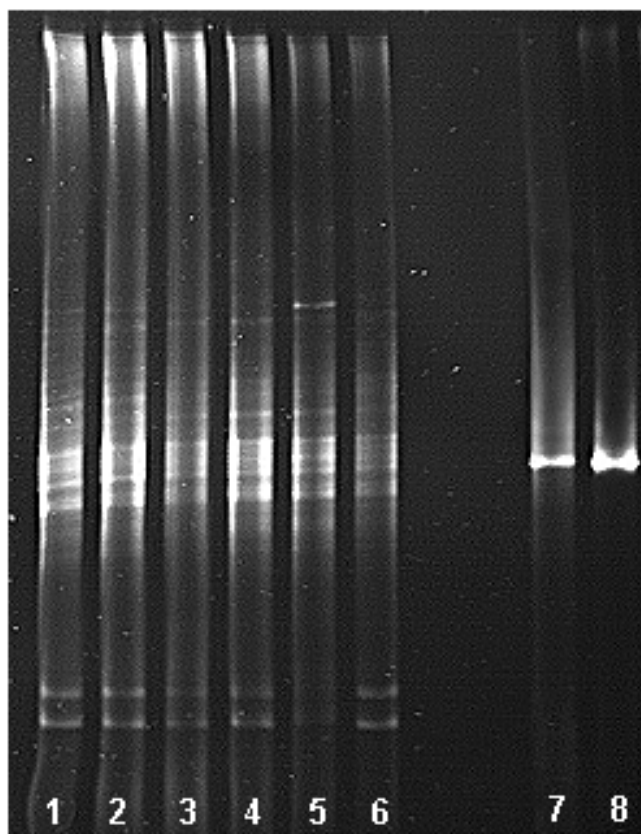


Рис. 4. DGGE-анализ амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК почвенных микробных сообществ из ризосфер экспериментальных растений. А – электрофореграмма суммарных амплификатов фрагментов гена 16S рРНК; В – схематическое изображение DGGE-профилей. Цифрами обозначены: 1 – сорт “Чародей”, биотехнологические растения, 2 – сорт “Чародей”, контроль, 3 – сорт “Голубизна”, биотехнологические растения, 4 – сорт “Голубизна”, контроль, 5 – сорт “Луговской”, биотехнологические растения, 6 – сорт “Луговской”, контроль, 7 – положительный контроль, *Thermoanaerobacter siderophilus*; 8 – положительный контроль, *Heliobacterium sulfidophilum*^T strain BR4.

В результате анализа не было выявлено различий в количестве полос, небольшая разница была отмечена в их интенсивности; однако этот факт вполне может быть следствием возможных ограничений техники ПЦР, лежащей в основе используемого метода. Отсутствие существенных различий в профилях может отражать как естественное сходство структур микробных сообществ исследуемых почв, так и являться следствием ограничений метода DGGE.

В целом, в результате DGGE-анализа нами была выявлена невысокая степень сложности микробных сообществ в данной агросистеме. Поэтому на следующем этапе нашей работы для проведения оценки биоразнообразия diaзотрофов мы создали и проанализировали шесть библиотек клонов фрагментов гена *nifH*.

2.2. Анализ библиотек клонов. Для всех экспериментальных образцов почв в пяти повторностях нами были получены ПЦР-фрагменты гена *nifH* требуемой длины – около 450 п.н. (рис. 5). Данные фрагменты были использованы для создания библиотек клонов. Для всех образцов почв нами было получено примерно по 100 клонов. На основании сходства нуклеотидных последовательностей все клоны были сгруппированы в 11 различных групп diaзотрофов (сиквенсных типов). Таким образом, в почвах КР и БР сорта “Чародей” было выявлено по 2 сиквенсных типа diaзотрофов, “Толубизна” – 5 сиквенсных типов в случае ризосферы КР и 8 в случае ризосферы БР, а “Луговской” – 4 и 7 сиквенсных типов, в случае ризосфер контрольных и опытных растений, соответственно. Последующий анализ данных сиквенсных типов был проведен с помощью построения филогенетических деревьев на основе транслированных последовательностей фрагментов гена *nifH* (рис. 6). Исходя из дендрограммы видно, что в целом структура diaзотрофного сообщества ризосферы картофеля была представлена небольшим количеством видов микроорганизмов, что согласуется с литературными данными в области оценки разнообразия азотфиксаторов в культивируемых почвах (Poly et al., 2001). Так же следует отметить, что, несмотря на внесение удобрений и различные обработки почвы, выявленная в наших исследованиях структура diaзотрофов, включающая небольшое количество обнаруженных сиквенсных типов, была представлена широким кругом филогенетических групп: Alpha-, Gamma-, Gamma/Betaproteobacteria и Deltaproteobacteria, Opitutae/Deltaproteobacteria, Clostridia, Bacilli, а также Methanomicrobia (Archaea).

Нами было показано, что в образцах почв КР и БР сорта “Чародей” обнаружены одни и те же сиквенсные типы diaзотрофов – ST1 и ST2. Низкий уровень сходства (84-87%) последовательностей данных сиквенсных типов с последовательностями известных микроорганизмов не позволил сделать однозначного заключения относительно их принадлежности к конкретному роду, скорее всего в данном случае можно говорить только о классе Bacilli как таковом. Согласно литературным данным различные представители рода *Paenibacillus* и *Bacillus* достаточно часто обнаруживаются в сельскохозяйственных почвах, и ризосфера БР картофеля при этом не является исключением (Lottmann et al., 1999). Некоторые штаммы *Paenibacillus durus* продуцируют вещества, подавляющие вредителей и патогенов, способствуя росту растений (Seldin et al., 1998; Gardener, 2004). Поэтому, наличие данных микроорганизмов в значительном количестве в сельскохозяйственной почве, в какой-то степени может служить признаком

благополучия агросистемы. То, что в двух вышеуказанных образцах почвы были обнаружены одни и те же сиквенсные типы diaзотрофов, вполне оправдано, так как экспериментальные делянки данного сорта располагались на поле в непосредственной близости.

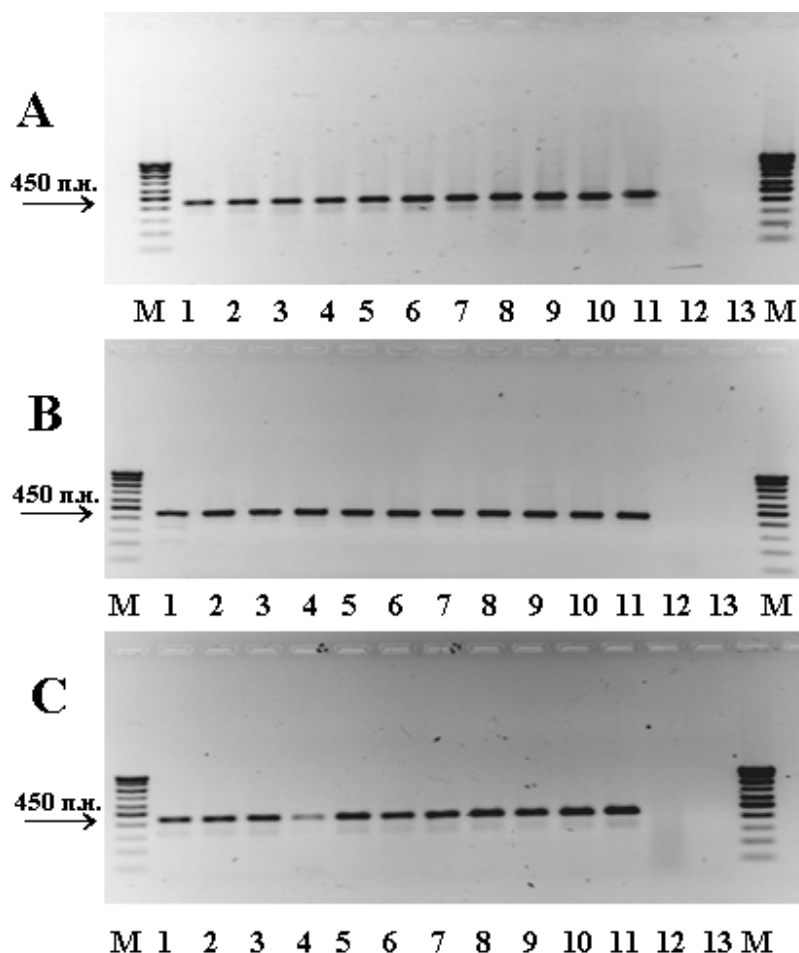


Рис. 5. Амплифицированные фрагменты гена *nifH* на ДНК, выделенной из почв экспериментальных участков (А – сорт картофеля “Луговской”; В – сорт картофеля “Голубизна”; С – сорт картофеля “Чародей”). Стрелками указан целевой фрагмент. М – маркер молекулярной массы ДНК (100 bp). Цифрами обозначены:
 1, 2, 3, 4, 5 – ДНК, выделенная из ризосферы КР;
 6, 7, 8, 9, 10 – ДНК, выделенная из ризосферы БР;
 11 – ДНК *Methylobacter vinelandii* (положительный контроль);
 12 – ДНК *Bacillus thuringiensis* (отрицательный контроль);
 13 – контроль в отсутствии ДНК-матрицы.

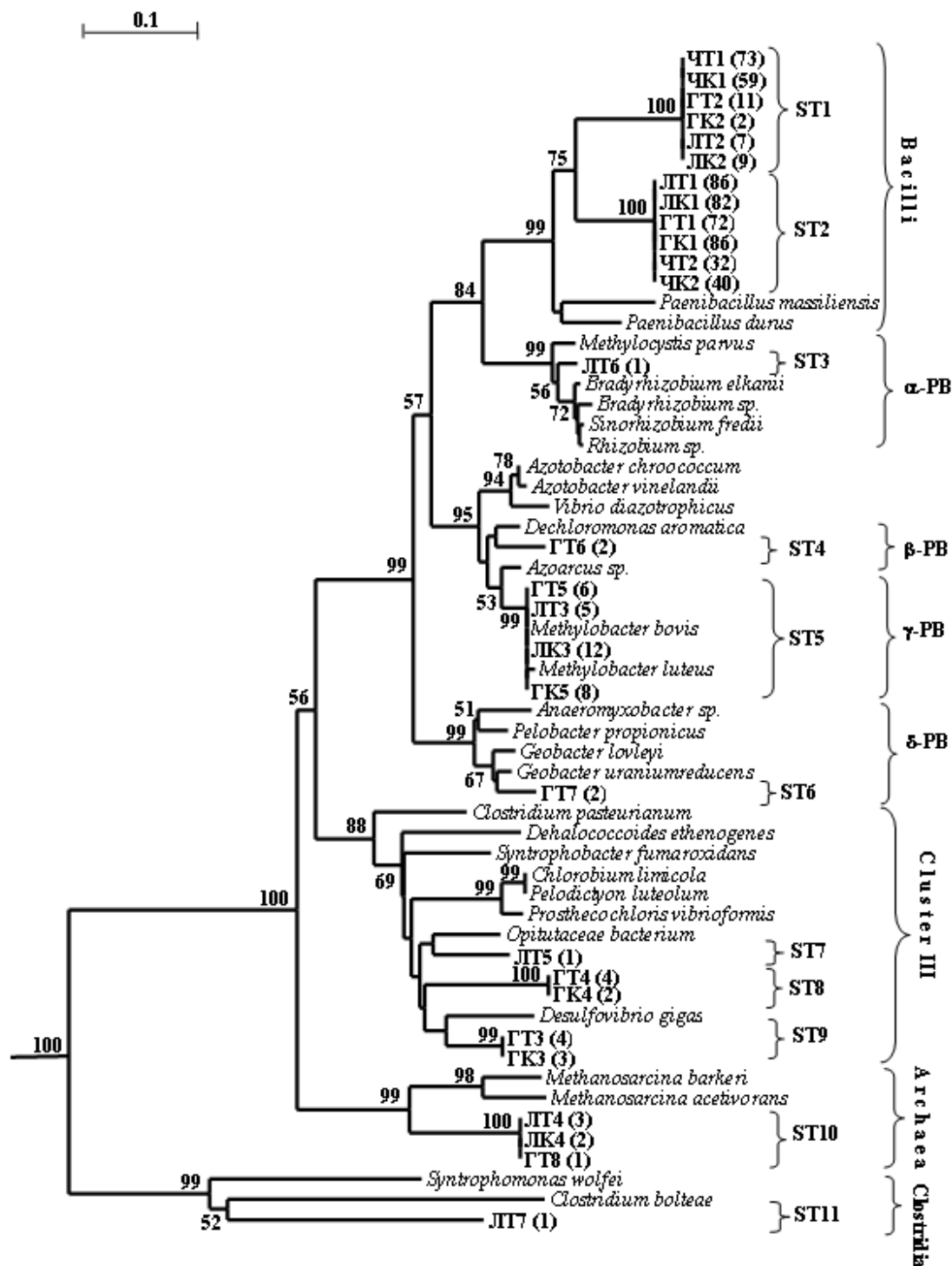


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное на основе транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов гена *nifH*. Масштаб соответствует 10 заменам на 100 аминокислотных остатков (эволюционным расстояниям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в процентах), определенная с помощью bootstrap-анализа 2000 альтернативных деревьев. Обозначения сиквенсных типов: ЧК – сорт “Чародей”, контроль; ЧТ – сорт “Чародей”, трансгенные растения; ЛК – сорт “Луговской”, контроль; ЛТ – сорт “Луговской”, трансгенные растения; ГК – сорт “Голубизна”, контроль; ГТ – сорт “Голубизна”, трансгенные растения. В скобках указано количество клонов. ST - общее обозначение идентичных сиквенсных типов. PB – Proteobacteria.

Анализ клонов из образцов почвы КР и БР сорта “Голубизна” выявил совпадение большинства сиквенсных типов: это ST1 и ST2, а также ST5, ST8 и ST9. Сиквенсный тип ST5 оказался идентичным с *Methylobacter bovis* (уровень сходства 100%). Наличие в пахотной почве метанотрофов I типа неоднократно отмечалось в работах других авторов (Кравченко и др., 2005). Преобладание среди метанотрофов I типа представителей родов *Methylobacter* и *Methylomonas* отмечалось на рисовых полях (Mohanty et al., 2006), а непосредственное присутствие *Methylobacter bovis* – в почвах, удобренных компостом или минеральными удобрениями (Vykova et al., 2007). В этой связи, обнаруженный в нашем исследовании представитель метанотрофов I типа не вызывает удивления. Сиквенсные типы ST8 и ST9 оказались внутри так называемого кластера III (Zehr et al., 2003), включающего в себя последовательности генов *nifH* некоторых облигатно анаэробных микроорганизмов, относящихся к Clostridia, Deltaproteobacteria, Spirochaetes, зеленым серным бактериям и археям. Более точная идентификация этой группы клонов не представляется возможным из-за низкого уровня сходства последовательностей (85-89%).

Три сиквенсных типа (ST4, ST6, ST10) были обнаружены только в ризосфере БР сорта “Голубизна”, и отсутствовали в контрольных образцах. Данные сиквенсные типы были представлены всего одним или двумя клонами и составляли, таким образом, минорную (не превышающую 2%) долю сообщества, выявление которой для данного объема исходной выборки вполне маловероятно. Поэтому достоверность их отсутствия в контроле очень мала. Следует отметить, что наличие небольшой разницы в составе diaзотрофных сообществ между ризосферами БР и КР может объясняться и эффектом удаления экспериментальных делянок друг от друга. вполне возможно, что в данном случае мы действительно имели дело с разными сообществами, отличающимися в минорных компонентах. Сиквенсный тип ST4 (2 клон) оказался наиболее близок к представителям двух классов – Gamma- и Betaproteobacteria (уровень сходства составлял 93-94% с различными представителями этих классов). Сиквенсный тип ST6 (2 клон) достаточно достоверно можно отнести к роду *Geobacter* (95% сходства), представители которого неоднократно обнаруживались в почве рисовых полей (Hori et al., 2007), а ST10 образовал общий кластер с представителями рода *Methanosarcina* (83% сходства), которые также являются обычными обитателями почв, причем отмечалось, что регулярное применение органических удобрений способствует уменьшению разнообразия архей в сторону доминирования метаногенов *Methanoculleus* и *Methanosarcina* (Gattinger et al., 2007).

Для сорта “Луговской” также было отмечено совпадение большинства сиквенсных типов diaзотрофов в образцах почв из-под КР и БР: это ST1, ST2, ST5, и ST10. Как и при исследовании ризосферы картофеля сорта “Голубизна”, в образцах почвы из-под БР сорта “Луговской” было выявлено наличие дополнительных трех сиквенсных типов – ST3, ST7, ST11, – которые

отсутствовали в контроле, и были представлены единичными клонами. При этом сиквенный тип ST3 образовал единый кластер с представителями ризобий (96-97% сходства), часто обнаруживающихся в пахотной почве (Palmer and Young, 2000). Сиквенный тип ST7 оказался наиболее близким к *Opitutaceae bacterium* TAV2, (уровень сходства 89%), представители которых часто выявлялись в различных почвах, а *Opitutus terrae* исходно был выделен из почвы рисового поля (Chin et al., 2001). Сиквенный тип ST11 (1 клон) с очень низким уровнем сходства (62%-69%) образовал общий кластер с представителями класса Clostridia.

В целом ризосферы БР всех трех сортов картофеля включали в себя все разнообразие diazotрофов, которое встречалось в ризосферах соответствующих сортов контрольных растений. Но для почв, отобранных из-под БР, все же наблюдалось наличие большего разнообразия diazотрофов по сравнению с контролем. Интересно отметить, что структуры сообществ азотфиксаторов в ризосферах всех трех сортов КР картофеля различались между собой. Так, у сортов “Голубизна” и “Луговской” сообщества оказались более разнообразными, чем у сорта “Чародей”, что проявилось в появлении дополнительных групп, одна из которых включала до 11% клонов. Между тем контрольные сорта “Голубизна” и “Луговской” тоже отличались между собой, однако это отличие было минорным (до 4% клонов). Подобные результаты были получены Миллинг с соавторами (Milling et al., 2004), в работе которых отмечалась разница в структурах микробных сообществ между ризосферами двух нетрансгенных сортов картофеля. Что касается БР, то подобным образом разнообразие азотфиксаторов в ризосферах сортов “Голубизна” и “Луговской” было выше по сравнению с третьим сортом “Чародей”, а структура diazотрофных сообществ в ризосферах БР сортов “Голубизна” и “Луговской” различалась между собой в минорных компонентах.

Соотношение представителей различных групп diazотрофных микроорганизмов, выявленных нами в пахотной почве представлено в таблице 2. Видно, что одна библиотека адекватно отражала разнообразие diazотрофов в анализируемой агросистеме только на уровне доминирующих членов сообщества. Использование в работе нескольких библиотек позволило провести более полный анализ микробного разнообразия за счет учета минорных представителей. Так же, исходя из таблицы 2 видно, что различия в составе diazотрофных сообществ почв, отобранных из ризосфер КР и БР, были не выше, чем различия между контролями всех трех сортов.

Таблица 2. Соотношение (% от общего количества клонов в каждой библиотеке) представителей различных групп diaзотрофов, выявленных в почвах экспериментальных участков

Филогенетическая группа	Растения*					
	ЧК	ЧТ	ГК	ГТ	ЛК	ЛТ
Bacilli (<i>Paenibacillus</i>)	100	100	87	81	87	89
Alphaproteobacteria (<i>Rhizobium/Bradyrhizobium</i>)	0	0	0	0	0	1
Gamma- и Betaproteobacteria (<i>Azotobacter/Dechloromonas</i>)	0	0	0	2	0	0
Gammaproteobacteria (<i>Methylobacter</i>)	0	0	8	6	11	5
Deltaproteobacteria (<i>Geobacter</i>)	0	0	0	2	0	0
Opitutae/Deltaproteobacteria	0	0	5	8	0	1
Methanomicobia (<i>Methanosarcina</i>)	0	0	0	1	2	3
Clostridia (<i>Syntrophomonas</i>)	0	0	0	0	0	1

* ЧК – сорт “Чародей”, контроль; ЧТ – сорт “Чародей”, трансгенные растения; ЛК – сорт “Луговской”, контроль; ЛТ – сорт “Луговской”, трансгенные растения; ГК – сорт “Голубизна”, контроль; ГТ – сорт “Голубизна”, трансгенные растения.

2.3. Статистический анализ. В результате аналитического расчета нами было показано, что все основные сиквенсные типы были охвачены нашими библиотеками. Что касается, миноров, которые не были нами выявлены в контрольных образцах почв из-под растений сортов “Голубизна” и “Луговской”, то возможно, с увеличением числа анализируемых клонов они были бы нами обнаружены, но для этого потребовалось бы значительное расширение библиотек.

Таким образом, в случае анализа экосистемы, подвергнутой антропогенному воздействию, объем выборки в 100 клонов оказался репрезентативным, отражая небольшое разнообразие diaзотрофов в образцах пахотной почвы. Анализ шести библиотек, построенных для образцов почв, отобранных из разных мест сельскохозяйственного участка, показал высокий уровень подобия результатов на уровне доминирующих членов популяции. Наблюдаемые небольшие вариации в видовом составе микроорганизмов, скорее всего, объясняются сортовыми особенностями растений картофеля. В целом, использование в работе шести библиотек позволило получить более полные сведения о видовом составе diaзотрофных микроорганизмов анализируемой агросистемы и сделало эти результаты более достоверными.

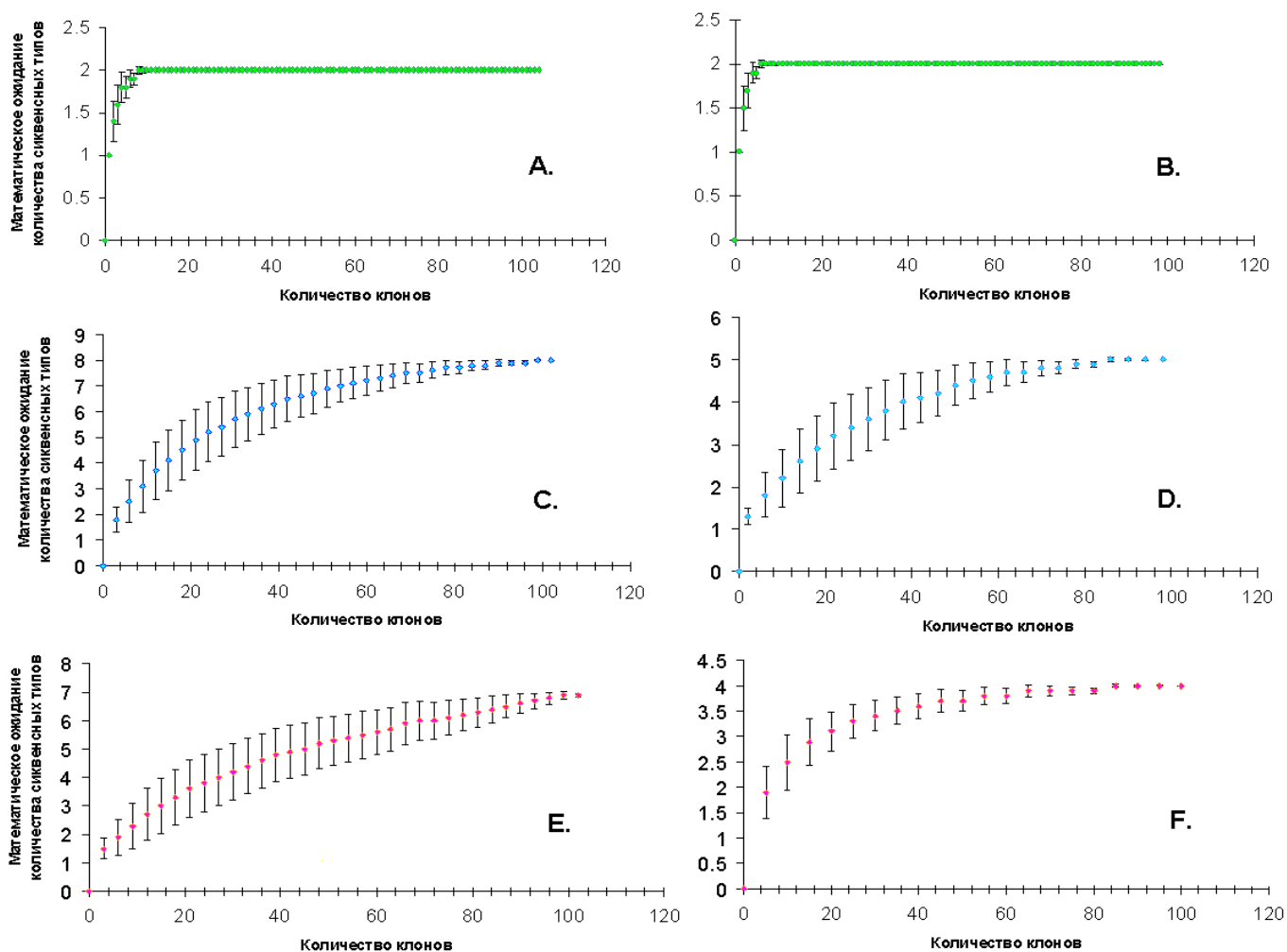


Рис. 7. Кривые зависимости математического ожидания количества сиквенсных типов в случайной выборке из библиотеки от размера этой выборки. Буквами обозначены: библиотеки клонов фрагментов гена *nifH* для ризосфер БР картофеля сортов “Чародей” (А), “Голубизна” (С), “Луговской” (Е); а также для ризосфер КР картофеля сортов “Чародей” (В), “Голубизна” (D), “Луговской” (F).

3. Сравнение структур diaзотрофных сообществ торфяной почвы и сельскохозяйственной почвы

Продвоя сравнение результатов, полученных для обеих экосистем, стоит еще раз отметить, что торфяная почва, которая традиционно считалась бедной diaзотрофами, отличалась существенным разнообразием азотфиксаторов по сравнению с пахотной почвой. В отличие от образца торфяной почвы, в котором все сиквенсные типы были представлены небольшим числом клонов, в ризосферах БР и КР картофеля было обнаружено преимущественное доминирование представителей, близких к роду *Paenibacillus*. Также стоит отметить различия на уровне крупных таксономических групп: если в образце почвы естественной экосистемы верхового болота главным

образом были представлены микроорганизмы класса Alphaproteobacteria, то в ризосфере агросистемы лидирующее положение занимали представители класса Bacilli.

Таким образом, полученные на основании наших исследований данные вносят важный вклад в понимание внутренних структур почвенных микробных сообществ азотфиксаторов в экосистемах с различной антропогенной нагрузкой. Наши результаты могут способствовать выделению и описанию новых микроорганизмов, а также применяться в дальнейших комплексных исследованиях микробных сообществ азотфиксирующих прокариот в болотных экосистемах и агроценозах. Более того, полученные нами результаты показывают необходимость дальнейших исследований по изучению разнообразия почвенных азотфиксаторов в экосистемах торфяных болот, поскольку исходя из наших исследований видно, что видовой потенциал diaзотрофов в данных экосистемах чрезвычайно высок.

ВЫВОДЫ:

1. Впервые исследовано биоразнообразие diaзотрофов торфяной почвы с помощью анализа библиотеки фрагментов гена *nifH* без использования предварительного скрининга клонов. Показано наличие 52 сиквенсных типов diaзотрофов с преимущественным преобладанием представителей класса Alphaproteobacteria. Установлено, что традиционного размера библиотеки в 100 клонов недостаточно для полного покрытия разнообразия diaзотрофов в данной экосистеме.

2. Впервые исследована структура diaзотрофных сообществ почв, отобранных из ризосфер контрольных и биотехнологических растений картофеля, с помощью анализа библиотеки клонов фрагментов гена *nifH*. Установлено наличие 11 сиквенсных типов diaзотрофов в данной агросистеме с доминированием представителей класса Bacilli. Показано, что одна библиотека адекватно отражает разнообразие diaзотрофов в агросистеме только на уровне доминантных членов сообщества.

3. Достоверных различий в структурах diaзотрофных сообществ между ризосферами биотехнологических и контрольных растений картофеля выявлено не было.

Список работ по материалам диссертации:

1. **Запороженко Е.В. (Задорина)**, Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв. Микробиология. – 2006. – Том 75, №1. – С. 127-134.
2. Булыгина Е.С., **Задорина Е.В.**, Кузнецов Б.Б. Исследование структуры diaзотрофного сообщества пахотной почвы. Аграрная наука. – 2008. – №4. – С. 13-15.
3. **Задорина Е.В.**, Булыгина Е.С., Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Скрыбин К.Г. Оценка влияния картофеля, устойчивого к фитофторозу, на структуру бактериальных сообществ почвы. Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – №1. (принята к печати).
4. **Задорина Е.В.**, Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Колганова Т.В., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Оценка применения метода клонирования для изучения разнообразия почвенных diaзотрофов. Микробиология. – 2009. – № 2, февраль (принята к печати).
5. **Задорина Е.В.**, Слободова Н.В., Колганова Т.В., Кравченко И.К., Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б. Изучение состава азотфиксирующего микробного сообщества сфагнового болота с помощью анализа генов *nifH*. 11 Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, 29 окт-2 ноября 2007 г. Сборник тезисов. С. – 36-37.
6. **Задорина Е.В.**, Булыгина Е.С. Применение анализа библиотек клонов для изучения влияния биотехнологического картофеля на состав diaзотрофного сообщества сельскохозяйственной почвы. Международная научно-практическая конференция “Биотехнология: вода и пищевые продукты”. Москва, 11-13 марта 2008 г. Материалы конференции, С. 203.
7. **Задорина Е.В.**, Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б. Использование DGGE-анализа для оценки влияния биотехнологического картофеля на структуру бактериальных сообществ почвы. XLVI Международная научная студенческая конференция. Новосибирск, 26-30 апр 2008 г. Материалы конференции, С. 65.
8. **Задорина Е.В.**, Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б. Оценка применения анализа библиотек клонов фрагментов гена *nifH* для изучения разнообразия почвенных diaзотрофных сообществ. XIII Международная экологическая студенческая конференция “Экология России и сопредельных территорий”. Новосибирск, 24 – 26 окт 2008 г. Материалы конференции, С. 117.