

## МИКРОБИОЛОГИЯ

Е.В. Бражникова<sup>1</sup>, Т.Д. Мукашева<sup>1</sup>, М.Х. Шигаева<sup>1</sup>, В.Л. Цзю<sup>2</sup>,  
Л.В. Игнатова<sup>1</sup>, Р.Ж. Бержанова<sup>1</sup>, Р.К. Сыдыкбекова<sup>1</sup>, М.Т. Каргаева<sup>1</sup>

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
В ОЦЕНКЕ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОЧВ**

(<sup>1</sup>НИИ Проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби,  
<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби)

*Существуют различные методы определения состава микробиоценоза. До недавнего времени основными являлись микробиологические и биохимические. Однако не все почвенные микроорганизмы могут быть выявлены с использованием этих методов. В настоящее время широко применяют молекулярно-биологические подходы для анализа природных микробных популяций. В статье описываются наиболее распространенные молекулярно-биологические методы изучения микробиоты почв. Приведены результаты различных исследований по определению микробного разнообразия почв при помощи методов молекулярной биологии. Показаны широкие возможности использования данных методов для анализа структуры и видового состава микробных сообществ, установления филогенетических связей, а также для выявления микроорганизмов, выполняющих определенную функциональную роль в экосистемах.*

Масса почвенной микробиоты составляет большую часть общей массы всех микроорганизмов нашей планеты. Сообщается, что один грамм почвы содержит до 10 миллиардов микроорганизмов и тысячи различных видов. Предполагается, что в почве обитают десятки тысяч видов бактерий, но лишь небольшая доля этих микроорганизмов (~20%) выделена и охарактеризована. По оценкам некоторых авторов, разнообразие почвенных грибов может достигать до 1,5 млн видов [1-7].

Однако сведения о биологии почвенных микроорганизмов, о видовом разнообразии, об их относительном обилии в различных типах почв весьма ограничены [8]. Получение новых экспериментальных данных ограничивается тем, что до недавнего времени отсутствовали адекватные высокоинформативные методы исследования микроорганизмов почвы в естественной среде их обитания. Большинство почвенных микроорганизмов не способны к культивированию в искусственных условиях. В таких сложных экосистемах, как почвы, количество культивируемых клеток редко превышает 5% от общего количества микроорганизмов. Соответственно, истинное число видов микроорганизмов и их относительное изобилие в почве до сих пор неизвестны [2, 5-8].

Наряду с традиционными методами идентификации микроорганизмов с использованием культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик, в последнее время все более широкое применение находят молекулярно-биологические подходы определения микроорганизмов [9, 10].

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

- создание филогенетической систематики микроорганизмов;
- идентификация штаммов с использованием филогенетической и фенотипической информации;
- выявление микроорганизмов окружающей среды без их культивирования [11].

Применение молекулярно-биологических методов в микробиологии дало возможность более глубокого изучения микробных сообществ. Данные методы позволяют идентифицировать и определять разнообразие микроорганизмов в различных средах, включая и организмы, которые не поддаются изучению при помощи традиционных микробиологических методов (так называемые «некультивируемые формы»). Отпадает необходимость использования трудоемких процедур посева, культивирования и выделения чистых культур микроорганизмов. Отсутствие стадии культивирования при таких подходах позволяет более полно оценить разнообразие микроорганизмов в окружающей среде. Кроме того, становится возможным изучать изменения состава почвенных микробных сообществ под воздействием различных факторов, идентифицировать отдельные природные микробные популяции или функциональные свойства сообществ, а также проводить мониторинг микроорганизмов, выделенных из сообществ [12-14].

Наиболее часто в последнее время в микробной экологии применяются следующие молекулярные методы исследования микробных сообществ почвы:

- изучение экстрактов ДНК из почвы при помощи метода реассоциации;
- изучение бактериальных популяций почвы *in situ* методом гибридизации с олигонуклеотидными маркерами (ДНК- и РНК-зондами), мечеными флуоресцентными красителями;
- изучение экстрактов ДНК из почвы методом дифференциального центрифугирования в градиенте CsCl;
- методы, основанные на исследовании при помощи полимеразной цепной реакции [2, 8, 15].

**Изучение экстрактов ДНК из почвы при помощи метода реассоциации.** Метод связан с определением скорости реассоциации ДНК, экстрагированной из почвы. Впервые он был применен для характеристики бактериального разнообразия сообществ почв осадков Торсвиком. Данный метод основан на связи гетерогенности препарата бактериальной ДНК со скоростью ее реассоциации. Гетерогенность ДНК является мерой общего количества генетически различных бактерий в почве. Процесс реассоциации выделенной и расплавленной ДНК исследуют спектрофотометрически в стандартном солевом растворе, используя геном *Escherichia coli* в качестве этанола. По мнению Торсвика, константа реассоциации является идеальной количественной характеристикой, выражающей количество пар оснований в негомологичной ДНК. Она эквивалентна размеру генома в целом и может быть использована для характеристики разнообразия бактериальных сообществ, а также происходящих в них изменений, связанных с различными воздействиями – природными и антропогенными [16, 17].

**Изучение бактериальных популяций почвы *in situ* методом гибридизации с олигонуклеотидными маркерами (ДНК- и РНК-зондами), мечеными флуоресцентными красителями.** Данный метод позволяет получить количественную информацию о метаболически активных или численно доминирующих популяций в почве. Он позволяет оценить относительное количество популяций, принадлежащих к определенным таксонам, на основании специфического связывания последовательностей 16S (реже 23S) рРНК со

специально подобранными олигонуклеотидными маркерами (зондами), сконструированными на основании информации, полученной из базы данных. Фрагмент рРНК внутри клетки искомого бактериального таксона выступает в качестве мишени, с которой специфически связывается олигонуклеотидный маркер с присоединенным флуоресцентным красителем, что позволяет легко диагностировать искомые клетки при просмотре препарата под микроскопом при освещении светом определенного диапазона длин волн, вызывающим специфическое свечение красителя. Реакция гибридизации зонда и мишени может быть проведена с препаратом клеток из почвенных суспензий, с концентрированными препаратами клеток из почвы, а также с экстрактами нуклеиновых кислот из природных образцов [18, 19].

**Изучение экстрактов ДНК из почвы при помощи дифференциального центрифугирования в градиенте CsCl.** Метод сводится к экстракции ДНК из почвы с ее дальнейшей очисткой и центрифугированием в предварительно созданном градиенте CsCl, что позволяет разделить тотальный препарат ДНК на фракции с разной плавучей плотностью. Зная, что плавучая плотность ДНК связана соответствующей формулой с мол.% Г+Ц, после соответствующих вычислений получают профиль, характеризующий долю молекул ДНК с различным мол.% Г+Ц в препарате тотальной ДНК бактериального сообщества. Полученные фракции ДНК могут быть в дальнейшем изучены более детально другими молекулярными методами – гибридизация, фингерпринт и т.д. [2, 8, 20].

**Методы, основанные на исследовании при помощи полимеразной цепной реакции.** На сегодняшний день большинство работ по оценке биоразнообразия почв и изучению филогенетических взаимоотношений внутри сообществ микроорганизмов базируются на исследованиях нуклеиновых кислот при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующими филогенетическими маркерами (16S рРНК, 18S рРНК и др.). Ген 16S рРНК имеет как высококонсервативные, так и быстро эволюционирующие, переменные районы, исследование которых дает важную эволюционную информацию. Состав и последовательность нуклеотидов 16S рРНК широко используется в настоящее время для выявления филогенетического родства между бактериями и активно применяется в таксономии и идентификации бактерий. Анализ

бактериального сообщества почвы состоит из следующих этапов:

- 1) получение препарата ДНК;
- 2) амплификация фрагментов последовательностей ДНК, кодирующих 16S рРНК при помощи ПЦР с универсальными и специфическими праймерами;
- 3) изучение амплифицированных последовательностей различными молекулярно-генетическими методами: методом прямого секвенирования, гибридизации с реперными последовательностями, разнообразными модификациями рестрикционного анализа с использованием различных приемов гель-электрофореза;
- 4) анализ полученной информации о последовательностях путем сравнения с доступными базами данных о последовательностях [2, 5, 8].

Исследование структуры гена 16S рРНК позволяет не только установить или уточнить таксономическое положение штаммов, но в иных ситуациях дать начало совершенно новым таксономическим группам. Количество идентифицированных по структурам 16S рРНК микроорганизмов удваивается ежегодно, что указывает на перспективность данного подхода [21, 22].

Далее будут приведены результаты нескольких исследований по определению микробного разнообразия почв при помощи молекулярно-генетических методов.

Ueda T., et. al. при изучении почвы под посевами сои было проанализировано 17 почвенных клонов. 3 клон отнесены к химерам, т.е. артефактам ПЦР. Констатируется наличие следующих крупных групп: грамположительные бактерии с высоким содержанием Г+Ц, зеленые серные бактерии, протеобактерии, креноархеи и клоны, которые не попадают ни в один из 11 известных основных фило типов домена Bacteria, представленных в виде филогенетического древа. Авторы обращают особое внимание на обнаружение в исследуемой почве последовательностей, характерных для археобактерий, принадлежащих к Crenarchaeota. Большинство других последовательностей имели очень отдаленное родство с последовательностями известных представителей бактерий. Лишь 2 почвенных клон имели высокую степень сходства – 95 и 97% – с представителями *Rhodocyclus gelatinosus* и *Pseudomonas flavescens*, один – 89,9% сходства с *Agrobacterium tumefaciens* [23].

Liesack W., et. al. в результате проведения анализа экстрактов ДНК почвы, отобранной у подножия горы из слоя 5-10 см (Австралия, Квинсленд), обнаружили присутствие двух больших групп последовательностей, близких к протеобактериям (подгруппы 2-альфа) и планктомицетам. Последовательности 3-й группы не могут быть отнесены ни к одному из известных таксонов и представляют, по мнению авторов, новую филогенетическую линию бактерий. Большинство клонов 1-го кластера (14 последовательностей) проявили существенную степень родства с азотфиксирующими симбиотическими бактериями альфа-подкласса протеобактерий: роды *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* и *Photrhizobium*. Семь клонов проявили отдаленное сходство с членами семейства *Planctomycetaceae*, представляющего уникальную эволюционную линию в царстве бактерий. Филогенетический анализ показал, что один из клонов был близок к *Planctomyces limnophilus*, а другой – к *Isosphaera pallida*. Однако степень родства между почвенными клонами и последовательностями генов 16S рРНК родов *Isosphaera* и *Gemmata* так низка (63-73%), что принадлежность клонов именно к этим родам весьма сомнительна. Остальные почвенные клоны (их 22) являются, по видимому, членами новой эволюционной ветви, имеющими общих предков среди планктомицетов и хламидий [24].

Широкое использование молекулярно-генетических методов, подробное изучение микроорганизмов – обитателей неисследованных ранее экологических ниш – приводят к описанию новых видов микроорганизмов. Потенциальным источником необычных, экстремальных форм микроорганизмов является Антарктика. Среди представителей антарктических биоценозов описаны бактерии рода *Pseudomonas*, однако сведения об их видовом разнообразии и биологических свойствах остаются довольно ограниченными. В работе было изучено видовое разнообразие бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из антарктических образцов, отобранных на Украинской антарктической станции Академик Вернадский. Из проб почвы, мха и донных отложений было выделено 59 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*. Исследование этих культур по 113 фенотипическим признакам и результаты идентификации при помощи ПЦР-амплификации и секвенирования гена 16S рРНК позволили отнести 25 штаммов к V биовару *P. fluorescens*, 22 – к биоварам А и В

*P. putida*, 2 – к *P. alcalifila*. Данные секвенса гипервариабельного участка гена 16S рРНК и фенотипического анализа позволили отнести 8 антарктических изолятов к *P. fragi* и *P. veronii*, а также показали принадлежность двух неидентифицированных штаммов псевдомонад к *P. fluorescens*-комплексу [25].

Бразильский атлантический лес является одной из 25 «горячих точек» биоразнообразия в мире. Хотя разнообразие его флоры и фауны изучено довольно хорошо, мало известно о его микробных сообществах. В работе был проведен анализ атлантической лесной экосистемы с целью определения ее бактериального разнообразия и изучения влияния физико-химических свойств почвы на распространение бактерий. Были проанализированы 754 клон из 10 образцов почв. На основании сравнения последовательностей гена 16S рРНК почвенных клонов с имеющейся в базах данных информацией об известных организмах бактериальное разнообразие было описано следующим образом: преобладающими являются *Acidobacteria* (63%), далее следуют *Proteobacteria* (25,2%), *Gemmatimonadetes* (1,6%), *Actinobacteria* (1,2%), *Bacteroidetes* (1%), *Chloroflexi* (0,66%), *Nitrospira* (0,4%), *Planctomycetes* (0,4%) и *Firmicutes* (0,26%). 48 последовательностей (6,5%) представлены неизвестными бактериями. Статистический анализ показал, что бактериальное разнообразие находится под влиянием таких факторов, как высота, соотношение  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ , содержание  $Al^{3+}$  и фосфора. В проанализированных пробах рН не оказывало значительного влияния на разнообразие [26].

В работе Слободовой было изучено разнообразие азотфиксаторов в образцах кислой торфяной почвы сфагнового верхового

болота с помощью анализа последовательностей гена *nifH*. Суммарная ДНК была выделена из образцов торфа, взятых с глубины 10-20 см. Получено и проанализировано 136 клонов. В ходе исследования выявлено значительное разнообразие азотфиксирующих микроорганизмов, принадлежащих к различным филогенетическим группам. Обнаруженные микроорганизмы принадлежали к следующим родам: *Methylocella*, *Methylocystis*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacter*, *Pelobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium* и др. Впервые в кислой торфяной почве показано присутствие микроорганизмов, близких к *Oscillochloris* и *Azospirillum*. Метод, основанный на сравнительном анализе последовательностей генов *nifH*, стал наиболее популярным для исследования биоразнообразия азотфиксирующих сообществ. Этот подход позволяет достаточно полно определить видовой состав сообщества, обладающего азотфиксирующим потенциалом [27].

Таким образом, внедрение молекулярно-биологических методов в почвенную микробиологию решает многие проблемы, связанные с оценкой микробного разнообразия почв при помощи традиционных микробиологических и биохимических методов. Молекулярно-биологические методы предлагают новые возможности для анализа структуры и видового состава микробных сообществ, установления филогенетических связей, а также для выявления микроорганизмов, выполняющих определенную функциональную роль в экосистемах. Среди данных методов наибольшее распространение получил метод амплификации генов-мишеней (ПЦР).

1. Добровольская Т.Г., Лысак Л.В., Звягинцев Д.Г. Почвы и микробное разнообразие // Почвоведение. – 1996. – №6. – С. 699-704.

2. Kirk J. L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. Methods of studying soil microbial diversity // Journal of Microbiological Methods. – 2004. - № 58. – P.69–188.

3. Saha P., Kumari S., Raipat B. S., Sinha M. P. Phylogenetic analysis of tolerant bacteria from *Parthenium hysterophorus* (L.) amended soil by bootstrap approach // International Journal of Microbiological Research. – 2011. - № 2 (2). – P.176-183

4. Ranjard L., Poly F., Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment // Res. Microbiol. – 2000. - № 151. – P.167–177.

5. Muyzer, G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // Applied and Environmental Microbiology. – 1993. - Vol. 59, № 3. - P. 695-700.

6. Наляя А.Г. Влияние экологических факторов на качественный и количественный состав микробиоты в почвах различных типов ландшафта: Автореф.... канд. биол. наук. - Уфа, 2010. – 23с.

7. Delmont T.O., Robe P., Cecillon, S., Clark I. M., Constancias F., Simonet P., Hirsch P. R., Vogel T. M. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity // Applied and Environmental Microbiology. – 2011 - Vol. 77, № 4. - P. 1315–1324.

8. Добровольская Т.Г., Лысак Л.В., Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г. Бактериальное разнообразие почв: оценка методов, возможностей, перспектив // Микробиология. – 2001. – Т.70, №2. – С.149 – 167.

9. Зернов Ю.П., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов

термолабильной щелочной фосфатазы // Биотехнология. – 2005. - №6. - С. 3-11.

10. Cornea C. P., Voaides C., Ciuca M., et. al. Molecular methods for assesment the bacterial communities from diferent type of soils in Romania // Not Bot Hort Agrobot Cluj. - 2011. - №39 (1). – P.64-70.

11. Патыка Н.В., Круглов Ю.В., Патыка В.Ф. Особенности филогенетических профилей прокариотических микроорганизмов подзолистых почв // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41., №3. – С.248 – 254.

12. Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // ISME J. – 2007. - № 1(4). – P.283-290.

13. Запороженко Е.В., Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв // Микробиология. – 2006. – Т.75, №1. – С.127-134.

14. Piterina A. V., Bartlett J., Pembroke J. T. Molecular analysis of bacterial community DNA in sludge undergoing autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD): pitfalls and improved methodology to enhance diversity recovery // Diversity. - 2010. - № 2. – P.505-526.

15. Olubukola O. Babalola. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria // African Journal of Biotechnology. – 2003. - Vol. 2, №12. - P 710-713.

16. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L. High diversity in DNA of soil bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 1990. - Vol.56, № 3. - P. 782-787.

17. Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.-A., Ovreas L. Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments // J. Biotechnol. - 1998. – V.64. – P.53–62.

18. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. – 1995. - V. 59, №. 1. - P. 143–169.

19. Cho J.-C., Tiedje J.M. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays // Applied and Environmental Microbiology. - 2001. - Vol. 67, № 8. - P. 3677–3682.

20. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh T.L., Flynn, S.J., Opening the black box of soil microbial diversity //Appl. Soil Ecol. - 1999. – № 13. – P.109–122.

21. Singh S. S., Schloter M., Tiwari S. C., Dkhar M. S. Diversity of community soil DNA and Bacteria in degraded and undegraded tropical forest soils of North-Eastern India as measured by ERIC–PCR fingerprints and 16S rDNA-DGGE profiles // J. Biol. Environ. Sci. – 2011. - № 5(15). – P.183-194.

22. Venkata rao.K , Lavakumar.V , Ravichandiran V., Vekateshan N., et. al. Molecular characterization of the bacteria isolated from soil // Journal of Advances in Drug Research. – 2011. - Vol 1, Issue 2. – P.37-45.

23. Ueda T., Suga Y., Matsuguchi T. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field // Eur. J. Soil. Sci. - 1995. - V.46. - P.415 – 421.

24. Liesack W., Stackebrandt E. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment // J. Bacteriol. - 1992 Aug. - V.174, № 15. - P.5072-5078.

25. Коцофляк О.И. Новые представители рода Pseudomonas из почв Антарктики // УАЖ. – 2006. - № 4-5. – С. 214-218.

26. Faoro H., Alves A. C., Souza E. M., Rigo L. U., Cruz L. M., Al-Janabi S. M., Monteiro R. A., Baura V. A., Pedrosa F. O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic forest // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. - Vol. 76, № 14. - P. 4744-4749.

27. Слободова Н.В. Изучение биоразнообразия азотфиксирующих прокариот кислых торфяных почв на основе анализа последовательностей генов nifH: Автореф.... канд. биол. наук. - Москва, 2006. – 24 с.

\*\*\*

*Микробиоценоздың құрамын анықтаудың түрлі тәсілдері бар. Осы уақытқа дейін биохимиялық және микробиологиялық тәсілдер ең негізгі болып саналды. Бірақ барлық топырақ микроорганизмдерін осы тәсілдер арқылы анықтау мүмкін емес. Қазіргі кезде табиғи микробтық популяцияларды талдау үшін молекулалық-биологиялық әдістер қолданады. Бұл мақалада топырақ микробиотасын зерттеуде кеңінен қолданылатын молекулалық-биологиялық әдістер сипатталады. Молекулалық биология әдісімен топырақтағы микробтық әртүрліліктің зерттеудің нәтижелері келтірілген. Аталған тәсілдерді қолданып, микробтық қауымдастықтың түрлік және құрылымдық құрамын талдау, филогенетикалық байланыстарды, сонымен қатар экожүйеде белгілі бір функционалдық қызмет атқаратын микроорганизмдер көрсетілген.*

\*\*\*

*There are various methods for assessing of the microbiocenosis structure. Until recently, the microbiological and biochemical methods were primary. However not all soil microorganisms can be revealed by these methods. Nowadays molecular-based techniques are widely applied for the analysis of microbic populations. In paper the most widespread molecular approaches for studying of soil microbial biota are described. Results of various researches of assessing microbial diversity in the soils using methods of molecular biology are shown. The opportunities of using these methods for microbial communities' structure and composition analysis, establishment of phylogenetic relations, and also for revealing of the microorganisms which perform the functional role in ecosystems are shown.*