

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН

УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР



**РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ
ВНУТРЕННИХ ВОДОЕМОВ РОССИИ**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Борок 2009

УДК 579.26 (07) (063)
ББК 28.4
Р-17

Ответственный редактор: д.б.н. А.М. Андреева
Рецензент: д.б.н. В.В. Алешин

Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России:
Учебно-методическое пособие. - Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус»,
2009. - 115 с.
ISBN 987-5-904234-07-2

В сборнике опубликованы материалы четырех Всероссийских школ молодых ученых по проблемам молекулярной экологии микробных сообществ, посвященные практическим вопросам определения разнообразия микробных сообществ внутренних водоемов России: Рыбинского водохранилища, озера Байкал, озер Доронинское и Арахлей (Забайкалье), термальных источников Восточных Саян (Бурятия), подземных вод Пермского края. Исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования «Молекулярные технологии» ИБВВ РАН. Основное внимание в материалах уделено адаптации методов пробоотбора к различным объектам – водным пробам, биоматам, накопительным культурам, донным пробам и ассоциатам с макрофитами. Пособие рассчитано на студентов, аспирантов и молодых ученых.

Библиограф. 151 назв. Ил. 23. Табл. 6.

УДК 579.26 (07) (063)
ББК 28.4

ISBN 987-5-904234-07-2

© Издательство «Принтхаус», 2009

© Учреждение Российской Академии наук
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 2009

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Предисловие	4
Молекулярные методы учета биоразнообразия <i>В.В. Алёшин</i>	5
Молекулярная экология микроорганизмов: факты, проблемы и перспективы <i>Н.Л. Белькова, Н.Н. Деникина</i>	39
Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ <i>Н.Л. Белькова</i>	53
Определение генетического разнообразия в накопительных культурах микроорганизмов <i>Э.В. Данилова, Н.Л. Белькова</i>	64
Определение условий пробоотбора для получения корректных молекулярно-генетических данных <i>О.П. Дагурова, Е.В. Суханова, И.В. Рыбакова, Е.В. Дзюба, Н.Л. Белькова</i>	75
Селективная детекция живых организмов в природных ассоциациях молекулярно-генетическим методом <i>И.В. Рыбакова, Р.А. Федоров, И.П. Рябцева, В.В. Большаков, Н.Л. Белькова</i>	90
Влияние условий первичной обработки водных проб на разнообразие получаемых генотипов на примере микробных сообществ пресного озера Арахлей (Забайкалье) <i>Е.Б. Матюгина, Н.Л. Белькова</i>	101
Генетическое разнообразие микробных сообществ подземных вод с разным типом минерализации <i>Н.М. Кашеварова, Н.Л. Белькова</i>	108

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данное учебно-методическое пособие издается по инициативе Центра коллективного пользования «Молекулярные технологии» ИБВВ РАН. В нем изложены материалы проводимых за период 2007-2009 гг. четырех всероссийских школ молодых ученых, посвященных использованию молекулярно-генетических методов в молекулярной экологии микробных сообществ. Целью издания материалов является ознакомление студентов, аспирантов и молодых ученых с классическими и оригинальными методическими подходами, разработанными в многолетних экспериментальных исследованиях специалистами в области молекулярной экологии микробных сообществ и апробированными молодыми учеными при изучении сообществ из пресноводных, подземных, морских и гидротермальных источников, бактериальных матов и микроорганизменных ассоциаций с высшими животными и растениями. На практических занятиях школ было проанализировано бактериальное разнообразие микробных сообществ из Рыбинского водохранилища, подземных вод Пермского края, содово-соленого озера Доронинское (Забайкалье), пресного озера Арахлей (Забайкалье), термальных источников Восточных Саян (Бурятия), залива Провал озера Байкал.

В сборнике представлены обзоры специалистов из НИИ физико-химической биологии (МГУ, г. Москва) и Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск), и материалы аспирантов и молодых ученых из Института биологии внутренних вод РАН (п. Борок, Ярославской обл.), Института природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН (г. Чита), Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ), Института экологии и генетики микроорганизмов Уро РАН (г. Пермь).

Зав. ЦКП «Молекулярные технологии» ИБВВ РАН

д.б.н. Андреева А.М.

Молекулярные методы учета биоразнообразия

В.В. Алешин

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова*

1. Зачем изучать ДНК планктона и бентоса

С точки зрения зоолога или ботаника дело это бессмысленное – в таком суммарном препарате ДНК перемешаны фрагменты геномов сотен и тысяч разных видов, и неизвестно каких. Метагеном Тихого океана объединяет все виды Пацифики, от бактериофагов до китов. Даже если мы найдем в метагеноме какой-то ген и поймем его функциональное назначение, мы в настоящее время не узнаем, какому виду этот ген принадлежит (разве только нам особенно повезет наткнуться на известный вид). Для традиционно мыслящих систематиков, находящихся в плену рутины, это равносильно бесполезности такой работы. Тем не менее, метагеномика уверенно входит в арсенал современной биологии. Это предопределено уровнем технического развития и требованиями практики. Даже в локальных местообитаниях, как ротовая полость человека, новые методы оценки дают четырехзначные числа видового разнообразия только бактерий, постоянно или временно там проживающих (Keijser et al., 2008), без учета грибов и протистов. Для практики это означает потенциальную возможность доступа к неограниченному разнообразию ферментов и биологически активных препаратов с различными свойствами, для медицины – идентификацию новых, неизвестных прежде патогенных микроорганизмов. Но этим дело не ограничивается. Новые данные заставляют пересматривать устоявшиеся положения общего характера. Например, появляются указания о патогенности определенных комплексов видов, каждый из которых в отдельности безвреден, то есть речь идет о необходимости ревизии правила Коха, более 100 лет лежавшего в основе медицинской микробиологии.

Одновременно мы расширяем коллекцию антимикробных препаратов – естественных средств управления микробным сообществом в природе. Из метагенома термальных вод методами биоинформатики (или прямым экспериментальным скринингом библиотек) извлекают гены термостабильных ферментов для биотехнологии, и а из метагенома глубоководных частей океана (там круглый год минус один градус ниже нуля) – такие же ферменты, активные при низких температурах. И это не только стиральный порошок для мытья посуды или стирки в холодной воде, это другой уровень биотехнологии, получающей доступ к неизвестному ранее разнообразию биопрепаратов. Биотехнологические фирмы понимают эти перспективы и не скупаются на расходы по метагеномике. Для академической науки еще важнее другие аспекты. Обнаруживая в составе метагеномов те или иные гены, кодирующие ключевые ферменты биохимических путей, можно представить функционирование сообщества, устройство биологических циклов элементов и потоков энергии в нем, а в будущем – их регуляцию, как бы физиологию «вырезанного» участка живого покрова Земли – Геомериды (Старынкевич, 1931). На новом уровне наука вновь приходит к эвристичности такого общего понимания организации жизни на Земле, когда весь живой покров следует рассматривать, в известном смысле, как живой организм с его жидкой соединительной тканью морей и океанов (Беклемишев, 1928) и его «метагеномом».

Другая, более привычная сторона, находящаяся полностью в рамках традиционной парадигмы зоологии и ботаники, может быть охарактеризована как доступный метод учета видового разнообразия. Мы сосредоточимся на этой стороне вопроса, понимая ее ограниченность, равно как и неизбежность такой постановки в виде перехода к будущему более общему пониманию биоразнообразия как характеристики живого покрова Земли.

2. Проблема видовой идентификации

2.1. Общая постановка проблемы. Для определения видовой принадлежности бактерии требуется вывести ее в культуру (что далеко не всегда удается), изучать биохимические и культуральные свойства; в этом случае идентификация традиционными методами может растянуться на недели и месяцы, когда нужна экспресс-диагностика (например, возбудителя болезни). В систематике одноклеточных эвкариотов – протистов, а также «трудных» группах животных или растений по силам разобраться только специалисту, затратившему многие годы на ее изучение. Если группа не принадлежит к числу особо важных в хозяйственном отношении, то специалистов по ней может оказаться один-два в мире, а то и вовсе не оказаться в настоящий момент. В результате коллекционные сборы остаются десятилетиями не определенными. Более того, косвенные оценки биоразнообразия показывают, что во многих группах, особенно микроорганизмов, экологических группах пикопланктона и мейобентоса и др. большинство видов остаются не описанными, а, с учетом трудозатрат на описание и наличия трудовых ресурсов в виде квалифицированных специалистов, многие виды так и останутся навсегда неописанными. Рационализм науки требует изъять идентификацию из сферы деятельности систематиков, вывести ее из области искусства (в случае «трудных» групп) и сделать общедоступной, передать ее техническому персоналу. В числе прочего, это позволит обрабатывать массовые пробы, сократить стоимость определения за счет экономии оплаты труда специалистов, первоначально высвободить рабочее время специалистов для творческой работы по ревизии, а в перспективе сократить число систематиков, поскольку основная часть их работы (видовое определение) перейдет в разряд анализов, проводимых техническим персоналом. Молекулярные диагностические признаки оказались идеальными для осуществления этой программы. Они многочисленны, их легко формализовать и интерпретировать, нетрудно

добывать, применяя стандартные процедуры согласно опубликованным методическим указаниям. Цена лабораторного анализа (без учета затрат на сбор образцов в природе) при условии массовых анализов может быть сокращена до 10 – 20 долларов США (если проводить его в РФ) или до 1 доллара США (если проводить его за границей).

Наибольшее практическое значение имеет идентификация микроорганизмов, но по понятным причинам наиболее широкую известность получили методы видовой идентификации, примененные к животным и растениям. Широкую популярность в газетах и журналах приобрела концепция «ДНК-штрихкода». Наиболее популярной меткой для видовой идентификации и различения близких видов животных становится нуклеотидная последовательность фрагмента гена субъединицы I цитохром с оксидазы (*coI* или *coxI*), кодируемого митохондриальной ДНК. Ряд свойств этого гена (для краткости мы здесь опускаем причины того, почему эти свойства именно таковы) обеспечивает его низкую внутривидовую и значительную межвидовую изменчивость. И здесь необходимо важное уточнение: вид здесь понимается не в типологическом, а в генетическом смысле – как генетически связанное посредством скрещиваний сообщество, относительно обособленное в природе от остальных. Есть у *coxI* и другие преимущества, например, высокая консервативность кодируемого белка и то обстоятельство, что огромное большинство закрепляющихся в эволюции мутаций представляют собой замены, а не инсерции и делеции. Замены преобладают и в эволюции и других белков, но в тех случаях, когда белки функционируют в составе мультимолекулярного комплекса, как COI, размер которого строго ограничен его положением внутри мембраны митохондрии, инсерции и делеции особенно редки по понятным причинам. Эти особенности облегчают выравнивание последовательностей и делают его более достоверным. В то же время многочисленные синонимичные мутации фиксируются с большой свободой. Это делает ген *coxI* прекрасным кандидатом на роль «штрихкода», пригодного для автоматической

идентификации видов животных (Hebert et al., 2003; Шнеер 2009; Лухтанов, Кузнецова, 2009). Для высших растений, по-видимому, для повышения достоверности идентификации потребуется дополнительная метка, в качестве которой предлагается последовательность интрона хлоропластного гена матуразы, *matK*, а для грибов данных по *coxI* мало, и наиболее перспективными в настоящее время считаются последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров генов рибосомных РНК, ITS1 и ITS2 (см. ниже). Международный консорциум (“Consortium for the Barcode of Life”, CBOL), сначала работавший на энтузиазме, а теперь получивший серьезное финансирование через гранты, обеспечивает поддержание общедоступной базы данных (<http://barcoding.si.edu/>) и ее расширение. Вскоре, по мере пополнения базы данных, видовая идентификация превратится в стандартную процедуру, включающую четыре этапа: 1) взятие образца ткани; 2) выделение ДНК; 3) амплификация нужного участка генома и определение его нуклеотидной последовательности; 4) сравнение полученной последовательности с базой данных.

Практические наработки CBOL не годятся для бактерий: у них нет митохондрий и интронов хлоропластного гена *matK*. Но благодаря этим работам происходит общий пересмотр отношения к систематике, замена линнеевской систематики филокодом (индексом, показывающим родство с другими видами), составляемым по простым, понятным, объективным критериям. Этот процесс теоретического переосмысления в равной степени важен и для ботаники, и для микробиологии.

2.2. Гены рибосомной РНК и методы их изучения. Задолго до создания CBOL в качестве удобных и универсальных молекул для филогенетических сравнений использовали рибосомные РНК. Рибосомы есть у всех живых существ, от человека до бактерий, и содержат гомологичные РНК. Если рассматривать ситуацию не с уровня сегодняшнего дня, а учитывать исторические обстоятельства, то важное преимущество рРНК состояло в том, что позволяло решить серьезные методические трудности, которые много лет

назад стояли на пути исследования генов. Тогда быстрого, удобного и дешевого метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) не существовало, и первой и главной трудностью было выделить целевые последовательности из геномной ДНК. Для рРНК ее можно было обойти, выделив РНК вместо ДНК (либо тотальную РНК – в ней около 85% по массе приходится на рРНК, либо сначала рибосомы, а из них чистую рРНК). Вторая методическая трудность состояла в определении длинных нуклеотидных последовательностей, и она решалась тем, что первоначально для анализа использовали 5S и 5,8S рРНК, размер которых 120-150 нуклеотидов. Нуклеотидную последовательность 5S и 5,8S рРНК определяли по методу Максама и Гилберта. В дальнейшем методики были адаптированы для секвенирования фрагментов 18S и 28S рРНК. Используя затравки к консервативным участкам рРНК, проводили с помощью ревертазы секвенирование по методу Сэнгера. Полная длина рРНК малой субчастицы рибосом эукариотов (18S рРНК, SSU rRNA, 16S-like rRNA) варьирует в диапазоне 1700 – 1800 нуклеотидов. РНК такой длины как раз соответствует в седиментационных опытах 18-ти единицам Сведберга (18S). Изредка размеры рРНК малой субчастицы выходят за указанные рамки (они меньше у микроспоридий (1350 н.), некоторых видов грегариин (1500 н.), приближаясь по размеру к прокариотическим, и больше у некоторых видов амёб, фораминифер, членистоногих (до 3500 н.)). Эти более чем двукратные различия обусловлены изменением длины отдельных наиболее вариабельных участков в составе рРНК и не меняют решительным образом ее архитектуры, почти не мешают выравниванию консервативных участков. При сравнении рРНК удаленных видов из разных типов или царств обнаруживается до 30% различий в последовательностях, это сотни специфических признаков-нуклеотидов; эти данные позволяют не только провести достоверную идентификацию, но и делать содержательные и обоснованные филогенетические выводы, точность которых впервые стала превосходить традиционные гипотезы. Но у первоначальных методик были и серьезные

ограничения: они требовали большого количества свежего материала и были неприменимы для исследования музейных образцов, мелких и редких организмов, кроме тех, что выведены в культуру.

Решительный методический прорыв произошел с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации целевых фрагментов ДНК (более подробно методика описана ниже). И вновь здесь сказалось преимущество генов рРНК перед белоккодирующими генами. К последним трудно подобрать универсальные затравки (праймеры) для ПЦР (см. ниже): эволюционно консервативные и даже идентичные участки белка кодируются у разных видов неодинаковыми нуклеотидными последовательностями из-за возможностей, предоставляемых вырожденностью генетического кода. Однако рибосомные РНК являются не посредником для трансляции, а макромолекулами, напрямую занятыми выполнением клеточных функций, поэтому их функционально важные участки консервируются на уровне нуклеотидных последовательностей. Еще одной удачей стало обстоятельство, что к числу консервативных участков относятся и концы 18S рРНК. К ним в лаборатории М. Согина были сконструированы более 20 лет назад (Medlin et al., 1988) универсальные праймеры А и В (рис. 1), пригодные для амплификации генов рРНК малой субчастицы самых разных видов эукариотов.

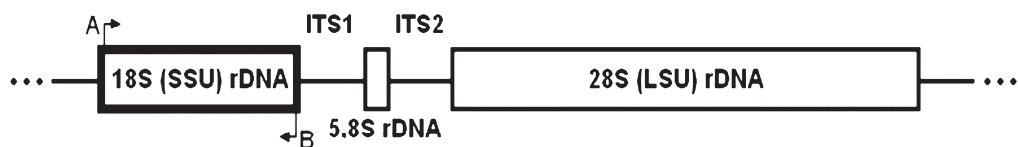


Рис. 1. Структура повторяющейся единицы (рибосомного оперона) в ядерном геноме эукариотов. ITS1, ITS2 – внутренние транскрибируемые спейсеры; А, В – положение праймеров для амплификации 18S рРНК.

Сконструированные праймеры не подходят к прокариотическому гену 16S рРНК, что позволяет не опасаться бактериальных загрязнений и избирательно амплифицировать эукариотические гены из сложных смесей. Точно так же были придуманы специфические праймеры к прокариотическому гену 16S рРНК, а также праймеры к другим участкам, не столь консервативным, которые позволяют специфически амплифицировать фрагменты гена рРНК животных, инфузорий, некоторых порядков бактерий и т. д.

Если нуклеотидные последовательности структурных генов 18S, 5,8S и 28S рРНК, входящих в состав молекулярной машины – рибосомы, отличаются высокой эволюционной консервативностью, то промежутки между ними – внутренние транскрибируемые спейсеры 1 и 2 (internal transcribed spacers, ITS1 и ITS2, см. рис. 1), далеко не так консервативны. Это определяется их физиологической ролью. Как известно, рибосомный оперон транскрибируется целиком, в виде единого предшественника, включающего рРНК и фрагменты между ними. Затем происходит созревание предшественника – вырезание из него тех фрагментов РНК, которые не войдут в состав рибосом, то есть спейсеров. Их главная роль, как считается, – правильно вырезаться, а с такой функцией оказывается совместима хотя и не любая последовательность, но практически бесчисленное их множество. Большинство мутаций в структурных генах рРНК оказываются вредными, поэтому эволюция рРНК происходит медленно, а в ITS1 и ITS2 большинство мутаций безразличны для функции. В результате значение рРНК и спейсеров для практических нужд таксономии разное. Например, 18S рРНК человека и лошади, двух относительно близких видов, отличаются всего 10-ью нуклеотидами из 1800 (примерно 7 замен и 3 делеции/вставки). Это сопоставимо с внутривидовой изменчивостью (и внутригеномной – ведь почти у всех эукариотов в геноме несколько сотен почти одинаковых копий генов рРНК). Этот пример показывает малую пригодность 18S рРНК для различения близких видов, по крайней мере в некоторых таксонах. Напротив,

последовательности ITS1 и ITS2 даже у близких видов всегда заметно отличаются.

В микробиологии понятие вида несколько отличается от действующего в зоологии и ботанике. Так и должно быть, потому что генетический обмен (именно он поддерживает генетическое единство вида животных или растений) у бактерий больше похож на манипуляции, применяемые в генетической инженерии, чем на половой процесс эвкариотов. Для генетической инженерии межвидовой перенос изолированного гена представляет в основном техническую проблему. Штаммы бактерий с отличиями в 16S рРНК до 3% принято относить к одному виду; это соглашение не вызывает возражений у микробиологов, хотя в зоологии и ботанике такой масштаб показался бы неудобным.

Если стоит задача филогенетического анализа, а не видовой идентификации в пучке, «букете» близких видов, — лучше рРНК ничего нет. То же, еще в большей мере, справедливо, если требуется отнести образец не к какому-то виду, а таксону более высокого ранга (роду, семейству, отряду, типу). Под этим лежат как исторические, так и более содержательные причины. Исторические обусловлены тем, что ни один из других генов не сравнится с рРНК по широте изученности. По сути 20 лет, начиная с прямого секвенирования, рРНК активно изучали в сравнительном плане. Каждая новая работа делала все более и более привлекательным для последующих авторов изучать именно рРНК, чтобы сравнить новые данные с непрерывно растущей базой данных, обеспечивалась своего рода положительная кооперативность в росте научного знания. Никакие другие гены в этом не могли конкурировать с рРНК. Среди слабо генетически изученных таксонов очень немного таких, где известные последовательности не включали бы генов рРНК, зато много таксонов, где гены рРНК — единственные, которые известны. Правда, в отношении бактерий, с прогрессом полногеномного секвенирования, это положение почти потеряло значение и быстро теряет его для эвкариотов. Но для прокариотов сохраняется особая роль генов рРНК как

потенциально наименее подверженных «горизонтальному» переносу. Гены рРНК все равно остаются особенно привлекательными ввиду наличия баз данных с выравниваниями, скорректированными на основании учета моделей вторичной структуры, интегрированных со специализированными средствами филогенетического анализа, поддерживающими различные сервисные функции в режиме удаленного доступа анонимных пользователей (Van de Peer et al., 2002; Cannone et al., 2002; Pruesse et al., 2007; Cole et al., 2009). Базы данных позволяют легко делать нужную таксономическую выборку. Например, база данных Ribosomal database project – II, версия 10, (<http://rdp.cme.msu.edu/>) на 5 октября 2009 г. содержит более 1 млн. 100 тыс. последовательностей 16S рРНК.

Часть ресурсов в настоящее время не поддерживается, но доступны в Интернете, как The European ribosomal RNA database (Van de Peer et al., 2002) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/>). Другие, как Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>), активно развиваются, в том числе разрабатывается специализированное программное обеспечение (DeSantis et al., 2003, 2006a, 2006b, Dalevi et al., 2007). Конечно, такое предпочтение в отношении рРНК не осуществилось, если бы сравнение рРНК имело только технические преимущества и было малосодержательным (Лебединский и др., 2007). Относительно большая протяженность 16S/18S рРНК давала простор для сравнения, наличие в составе макромолекулы участков с разной степенью консервативности позволяет проводить сравнения на разных таксономических уровнях. Это, естественно, не означает, что рРНК являются универсальными филогенетическими маркерами всех узлов филогенетического дерева. В некоторых группах, где рРНК изменялась в эволюции слишком быстро или слишком медленно, более выгодными оказываются другие маркеры. И все же из разных маркеров рРНК – наиболее универсальный. Такова сегодняшняя практика.

2.3. ПЦР: прорыв в новые области исследования и мелкие трудности.

Методика полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет умножить

количество целевого продукта в миллионы раз. Это делает доступными для исследований микроскопически малые количества биологического материала, вплоть до единичных клеток, образцы плохой сохранности с частично деградированной ДНК (если сохранился хотя бы один протяженный фрагмент ДНК с полным геном рРНК на пробирку, то есть шанс «выловить» его с помощью ПЦР). По мере совершенствования методик рядовым делом стали анализы ДНК сухих гербарных образцов столетней давности, высохших капель крови, слюны, экскрементов (благодаря слущенным клеткам ротового или кишечного эпителия), волосяных луковиц и перьев, субфоссильных остатков и виде костей или мягких тканей, сохранявшихся в вечной мерзлоте. Примерно через 10 лет после адаптации техники ПЦР для амплификации рДНК она была применена для оценки разнообразия эвкариотических микроорганизмов в природных сообществах путем анализа сложных смесей ДНК, выделенных из разнородной клеточной популяции.

Схематически такой анализ (рис. 2) включает ряд последовательных стадий и начинается с отбора проб и, в случае необходимости, их фракционирования (например, концентрации планктонных организмов, фракционирования их по размеру путем фильтрации сначала через грубый префильтр, затем сборе мельчайших частиц на мембранном фильтре, и т. п.).

На следующем этапе проводится выделение ДНК (или РНК) по одной из стандартных методик: субстрат, содержащий клетки, суспендируют в буфере, и добавлением детергента проводят лизис клеток; затем нуклеиновые кислоты очищают одним из способов. Необходимо учитывать, что некоторые субстраты могут содержать примеси, неблагоприятно сказывающиеся на последующих процедурах, а некоторые минеральные примеси, например, силикаты, обычные в почве, способны при определенных условиях сорбировать ДНК. В таких случаях может потребоваться оптимизация выделения и очистки ДНК.

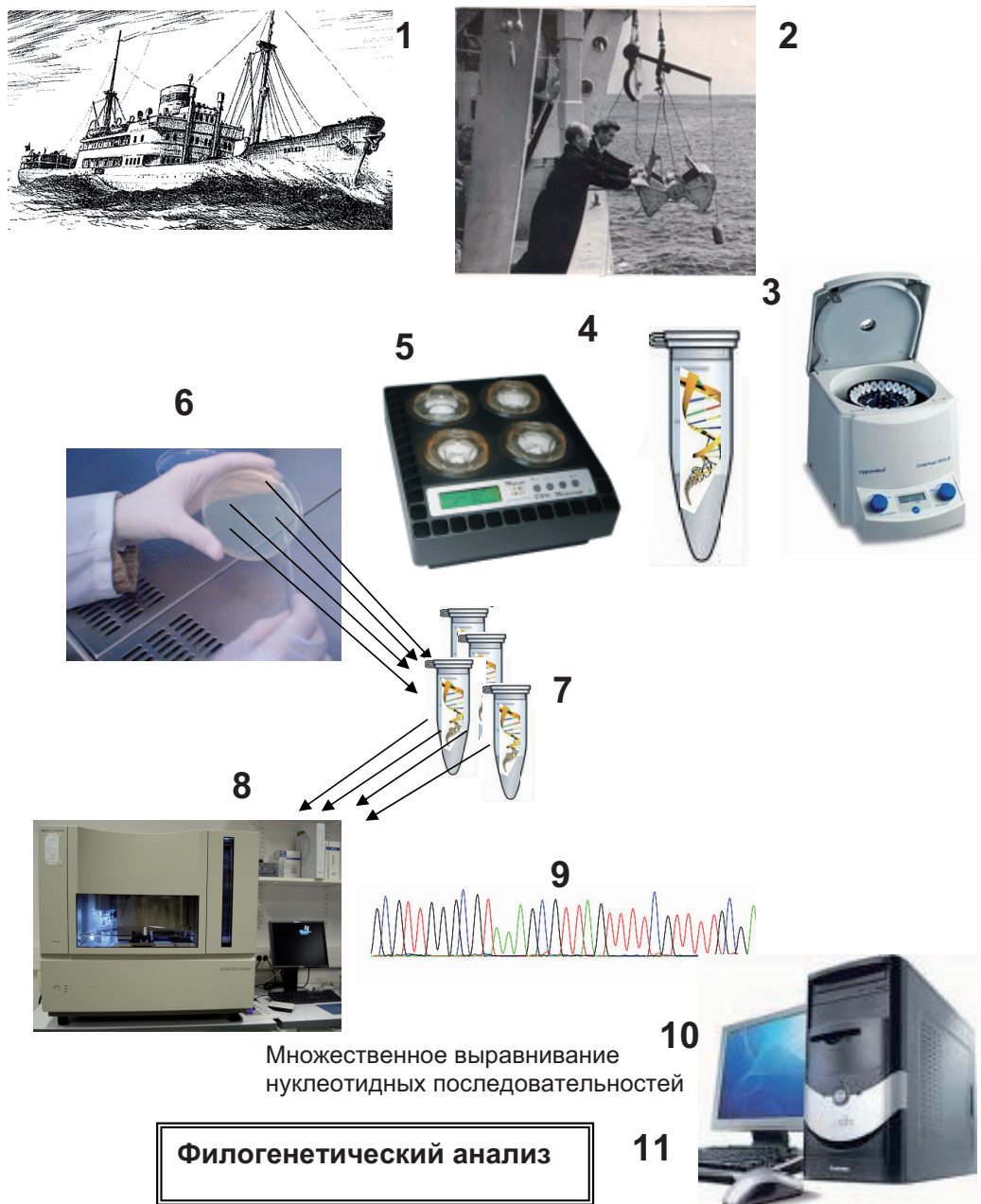


Рис. 2. Общая схема исследований ДНК из природных субстратов:
 1, 2 – отбор биологических проб, фракционирование; 3, 4 – выделение ДНК;
 5 – амплификация целевых последовательностей с помощью ПЦР; 6 –
 клонирование фрагментов ДНК в *E.coli*; 7 – отбор клонов и выделение
 плазмидной ДНК; 8, 9 – определение нуклеотидных последовательностей
 плазмидных ДНК отдельных клонов; 10, 11 – анализ последовательностей.

Полученный препарат ДНК используют для ПЦР с парой олигонуклеотидных затравок (праймеров), комплементарных эволюционно консервативным участкам гена рРНК. Такие праймеры способны отжигаться с ДНК разных видов, присутствующих в смеси. Результатом ПЦР является смесь фрагментов близкого размера, но разной (поскольку они амплифицированы с ДНК разных видов), нуклеотидной последовательности. Для того, чтобы определить индивидуальную нуклеотидную последовательность, ее надо выделить из смеси. Традиционный способ – клонировать фрагменты ДНК в клетках кишечной палочки (рис. 2). Для этого полученные фрагменты ДНК, амплифицированные в ходе ПЦР, очищают от других продуктов реакции, лигируют с векторной плазмидной ДНК, трансформируют клетки кишечной палочки лигазной смесью и высевают на чашки Петри с селективной средой. Из выросших колоний отбирают рекомбинантные, из бактерий выделяют плазмидную ДНК и определяют нуклеотидную последовательность клонированного фрагмента. Теперь ее можно сравнить с имеющимися в базе данных последовательностями рРНК для идентификации, а также с последовательностями других рекомбинантных клонов, полученных в этом или других экспериментах. Учитывая, что до 99% бактерий не удастся вывести в культуру, да и культивирование эукариотических микроорганизмов немногим проще, исследователи получили мощный инструмент исследования биологического разнообразия. И, между прочим, с удивлением обнаружили, что те штаммы бактерий, которые они выделяют из природы, как правило, не обнаруживаются при исследовании ДНК, выделенной непосредственно из субстрата. Это значит, что культивируемые штаммы бактерий, как правило, играют в природных сообществах незначительную роль из-за их низкой численности и являются высоко специализированными формами, способными к активному размножению в редких условиях, которые моделируются при лабораторном культивировании.

Несмотря на простоту изложенной схемы, имеется несколько источников неприятностей, возможных при проведении опытов. Они, в общем, выяснились вскоре после начала применения ПЦР для целей исследования микробных сообществ (von Wintzingerode et al., 1997). Одно из затруднений связано с неоднородностью микробного населения, преобладанием в нем немногих видов. На эти, наиболее массовые виды, может приходиться значительная доля клонов в клонотеке. Если поставлена задача оценить разнообразие, а не относительную численность видов, то, прежде чем проводить секвенирование сотен плазмид, сначала надо проверить три-четыре десятка. Если в пробной партии преобладает несколько типов последовательностей, то разумнее отказаться от дальнейшего изучения полученной клонотеки ради экономии средств. Если преобладающим будет три-четыре типа, то их можно выбраковывать перед секвенированием. Для этого перед выделением плазмидной ДНК полезно скринировать колонии: провести ПЦР с колоний, полученный продукт (фрагмент ДНК) гидролизовать мелкощепящей эндонуклеазой рестрикции (узнающей четырехнуклеотидную мишень в ДНК), полученный набор фрагментов ДНК анализировать электрофорезом в 1,5 – 2% агарозном геле, и колонии, порождающие мажорный тип распределения полос, исключить из дальнейшего анализа. Однако такая предварительная проверка сильно увеличивает трудозатраты и бывает недостаточно эффективна, если надо выбраковывать более чем 3-4 типа фрагментов. Другая методическая опасность, подстерегающая при ПЦР – опасность получения химер. Представим, что в ходе синтеза ДНК на какой-то конкретной матрице *Taq*-полимеразы не успела скопировать участок между праймерами полностью (или произошел обрыв матрицы в результате фрагментации ДНК в ходе выделения или многократного нагревания при ПЦР). Такой неполный продукт сам сможет на следующем цикле выступить как длинный «праймер», а, учитывая высокое сходство рРНК разных видов, он может отжечься не только к «своему», но и к чужеродному гену рРНК (если обрыв

произошел не в варибельной, а в консервативной области гена). В таком случае к последовательности вида X будут добавлены нуклеотиды, комплементарные матрице вида Y. Такие химеры, в зависимости от качества ДНК и таксономического разнообразия пробы, могут составлять от доли процента до нескольких процентов от числа клонов. Их химерность выявляется при анализе последовательностей. Разработаны компьютерные программы, облегчающие выявление химер. Однако простейшие автоматические процедуры не гарантируют выявление химерного происхождения последовательностей, возникшие на основе более чем двух матриц или же относящихся к таксонам, не представленным в базе данных.

Традиционный метод позволяет провести не только состав микробного населения, но и дать количественную оценку соотношения микроорганизмов в пробе – то, о чем раньше микробиолог не мог и мечтать, учитывая то обстоятельство, что более 90% микроорганизмов не удается вывести в культуру и идентифицировать. Теперь можно более адекватно оценить, какие виды более разнообразны в природе, а не те, которые лучше культивируются. Однако при учете населения по рРНК имеются источники ошибок и искажений. Самое главное – хотя праймеры и считаются «универсальными», нет такого закона природы, запрещающего эволюционные изменения даже самых важных макромолекул и их самых консервативных участков. При особых стечениях обстоятельств мутации в таких областях генов оказываются витальными, и могут фиксироваться. К такой ДНК «универсальный» праймер будет хуже подходить, этот ген будет менее эффективно амплифицироваться в ПЦР и окажется недопредставлен в смеси продуктов. К тому же результату приведет удлинение гена за счет протяженных инсерций в варибельные участки (как в рРНК некоторых амёб, кинетопластид, эвгленовых и др.) или наличие в таких участках GC-богатых последовательностей, способных образовывать тугоплавкие «шпильки», затрудняющие «продвижение» *Taq*-полимеразы. Менее чем 15% разница в эффективности ПЦР приведет за 30 циклов к 100-кратной разнице

в количестве продукта (Sogin et al., 2006). Особо длинные, GC-богатые и тем более последовательности с измененными мишенями для отжига хотя бы одного праймера могут вообще потеряться при традиционной постановке ПЦР. Таким образом, количественные оценки по соотношению клонов в клонотеках следует рассматривать как предварительные, да и качественные оценки следует считать заниженными. Если у какого-то вида рибосомный оперон имеет много или мало копий в геноме (по сравнению с «средним» для эукариотов 200-400 копиями), то это тоже скажется на выходе продукта и соотношении клонов. По этой же причине затруднено сравнение численности одноклеточных и многоклеточных. У бактерий также бывает по несколько копий гена 16S рРНК, причем, в этих случаях, обычны внутригеномные различия, которые вполне могут быть приняты за межвидовые. Необходимо также учитывать, что описания сообществ с высоким разнообразием микроорганизмов могут потребовать весьма обширных исследований для выявления более редких видов. По приводимым оценкам (Dunbar et al., 2002), для обнаружения половины видов из общего состава почвенной микрофлоры одной из станций в штате Аризона достаточно секвенировать 10 – 40 тыс. клонов. А для получения статистически значимых и воспроизводимых количественных данных (пренебрегая перечисленными выше источниками артефактов) может потребоваться на порядок больше определений, что является чересчур затратным. Новые данные, полученные с помощью методов высокопроизводительного секвенирования, заставляют, однако, считать такие оценки чересчур оптимистичными (см. ниже).

2.4. Методы высокопроизводительного секвенирования. Часть описанных выше проблем ПЦР (различная эффективность амплификации матриц, создание химер) до некоторой степени преодолеваются новыми методами высокопроизводительного секвенирования. Эти методы заменяют клонирование в живых клетках «молекулярным клонированием» с применением нанотехнологий – эмульсионной или твердофазной амплификацией фрагментов ДНК, или секвенированием отдельных

неамплифицированных фрагментов ДНК в пиколитровых реакторах. Первая из получивших распространение – технология эмульсионной ПЦР и пиросеквенирования, разработанная до уровня практического применения компанией 454 Life Sciences (см. обзор: Натальин, 2008). Технология 454 Life Sciences включает несколько этапов. Вначале ДНК фрагментируют и к концам фрагментов присоединяют адаптеры. Эти адаптеры позволяют ДНК присоединиться к специально приготовленным мельчайшим стеклянным шарикам. Далее раствор ДНК в буфере сильно разбавляют и смешивают с шариками, так чтобы на один шарик приходилось не более одного фрагмента ДНК. Такую суспензию шариков смешивают с маслом и получают тонкую эмульсию: взвесь мельчайших капелек буфера в масле. А в каждой капельке буфера – по одному стеклянному шарiku с присоединенной молекулой ДНК. Затем проводят ПЦР. Затравками (праймерами) выступают иммобилизованные на стекло дезоксиолигонуклеотды, комплементарные адаптерам. В каждой капельке один шарик и одна молекула матрицы, в ходе ПЦР она амплифицируется в миллионы раз, и ее копии окажутся присоединены к шарiku. Здесь исключается конкуренция матриц за *Taq*-полимеразу и создание химер. Остается отмыть шарики от масла, отделить те из них, которые по случайности остались без ДНК и переходить к следующему этапу – секвенированию. Для этого шарики помещают на пластинку с лунками, по одному шарiku на лунку. На сегодня применяют пластинки с плотностью 480 лунок на квадратный миллиметр и общим числом 1 млн. 600 тыс. лунок на пластинку. Именно столько фрагментов ДНК одновременно анализируется в опыте. Далее на пластинку циклически подают реагенты для проведения секвенирующей реакции. О встраивании подаваемого нуклеотида судят по освобождаемому пирофосфату, который детектируют с помощью дополнительных ферментативных реакций, сопровождающихся люминесценцией. Дно пластинки соединено с оптоволоконным световодом для регистрации люминесценции (при подаче какого нуклеотида она происходит в каждой лунке).

Технология 454 позволяет одновременно анализировать 1 млн. 600 тыс. фрагментов ДНК и за один опыт полностью определить небольшой бактериальный геном. Если в смеси присутствует ДНК нескольких видов, то, по результатам нескольких опытов, по перекрывающимся фрагментам можно составить полный (или почти полный) геном преобладающего вида и более или менее протяженные контиги (наборы перекрывающихся фрагментов) более редких в пробе видов. Такие данные будут метагеномом. Природный метагеном морского планктона или кишечника человека включает геномы бактерий, вирусов и бактериофагов, эукариотических микроорганизмов и многоклеточных, хотя, обычно, на стадии подготовки проб ограничиваются микроскопически малыми объектами из размерного класса бактерий (рыб и червей из пробы выбрасывают). Определить метагеном – задача в тысячи раз сложнее, чем, скажем, геном человека. Видовая принадлежность большинства найденных генов остаются неизвестной, но тип кодируемого фермента (эстераза, гликозилгидролаза и т. д.) может быть установлена методами биоинформатики, а найденные гены – экспрессированы в бактериальных клетках и испытаны для нужд биотехнологии. Небольшая часть метагенома (примерно 0,01%) приходится на гены рРНК, и они, с большей или меньшей точностью, могут быть отнесены к известным (или неизвестным) таксонам. Ведь только для единственного гена, рРНК малой субъединицы, собрана достаточно представительная выборка, позволяющая определить систематическое положение исследуемого организма с приемлемой точностью. Вначале технология 454 была применена для изучения разнообразия населения «необычных» местообитаний: глубоководных морских станций (Sogin et al., 2006; Huber et al., 2007), железорудной шахты в Миннесоте (Edwards et al., 2006), бактериальных матов горячих источников Йеллоустонского парка (Miller et al., 2009). Затем эта же технология применена к учету бактериальной флоры ротовой полости, гортани и фекалий человека (Andersson et al., 2008; Keijser et al., 2008) и других сообществ.

Если технологию 454 применить не к геномной ДНК, а к амплифицированным с помощью «обычной» ПЦР фрагментам рРНК, то почти каждый из 1 млн. 600 тыс. образцов можно будет отнести к таксону более или менее высокого ранга, и население изучаемой пробы будет определено с большой точностью. Ввиду огромного числа анализируемых фрагментов, будут обнаружены даже очень редкие организмы, представленные небольшим числом клеток (если их гены рРНК амплифицируются в ПЦР). Насколько полно такая техника позволяет учесть микробное разнообразие? Рассмотрим в качестве наглядного примера исследование с применением технологии 454 двух близко расположенных, но сильно отличающихся по химизму и микробному населению глубоководных гидротерм (Huber et al., 2007). В этой работе мишенью для ПЦР служил небольшой, около 100 н. п. длиной, гипервариабельный фрагмент гена 16S рРНК. Предполагается, что ввиду малого размера матрицы разница в эффективности амплификации разных последовательностей пренебрежимо мала. Клетки были собраны фильтрацией одного или двух литров морской воды через мембрану с диаметром пор 0,2 мкм. Общий титр в обеих станциях составлял около 10^5 клеток на 1 мл. Всего из двух библиотек было секвенировано около 900 тыс. последовательностей эвбактерий и архей, всего обнаружено более 36 тыс. различных вариантов. Если исключить варианты, отличающиеся единичными нуклеотидами и установить порог в 3% различий (такой порог обычно микробиологи принимают для разных «видов»), то число обнаруженных вариантов оказывается чуть больше 20 тыс. Более 98% вариантов были очень редкими – встречались менее чем 100 раз на 900 тыс. образцов каждый и, в основном, не могли быть обнаружены методом капиллярного секвенирования клонотек. Экстраполяция кривой насыщения в зависимости от размера выборки дает оценку суммарного бактериально-архейного разнообразия в двух станциях (с порогом не менее 3% различий в сравниваемой вариабельной области 16S рРНК) в 40 тыс.

видов – при условии, если б было секвенировано не 900 тыс., а «бесконечное» число образцов с этих двух станций.

Таким образом, для исчерпывающего анализа микробного разнообразия даже производительность технологии 454 недостаточна, хотя для анализа простой смеси генов или выявления наиболее массовых компонентов запуск прибора даже является избыточным. Для этих случаев разработаны методы мультиплексного анализа, например, индивидуальная, специфическая для пробы метка в составе адаптера, их могут быть десятки, а в перспективе – тысячи (Hamady et al., 2008), или можно, приготовив несколько независимых библиотек (несколько геномов, несколько проб природных субстратов) нанести их на разные поля рабочей ячейки. Ячейка может быть разделена на 2, 4 или 8 полей.

Пока, однако, и технология 454, и другие технологии высокопроизводительного секвенирования, не вытеснили традиционного анализа клонотек, как атомное оружие не вытеснило стрелковое и даже холодное оружие, для применения которых остается своя ниша. Это определяется дороговизной приборов (до полумиллиона долларов США) и расходных материалов. Например, затраты на расходные материалы по технологии 454 составляют 10 – 20 тыс. долларов США на один опыт. Хотя цена, в пересчете на одну сиквенсную реакцию, меньше примерно в 1000 раз по сравнению с капиллярным секвенированием, общая высокая цена опыта заставляет каждый раз задумываться о целесообразности его проведения.

3. Виды-двойники и их молекулярная идентификация

Необходимость дополнительных методов учета видового разнообразия, кроме световой микроскопии, была поставлена на повестку открытием так называемых видов-двойников. В протистологии эта проблема известна с 50-х гг., начиная с работ Соннеборна по «типам спаривания» инфузорий *Paramecium* (Sonneborn, 1975). Для форм, внешне неотличимых, но

изолированных генетически, сравнение генетического материала, ДНК, является прямым и наиболее адекватным способом выявления различий. Заметим, с развитием программы «ДНК-штрихкодирования» (Hebert et al., 2003; Шнеер 2009; Лухтанов, Кузнецова, 2009) этот способ постепенно становится и наиболее дешевым, в перспективе выводящим видовую диагностику из искусства отдельных высококвалифицированных или уникальных специалистов по группе в разряд дешевого лабораторного анализа, выполняемого лаборантом. Программа автоматической видовой идентификации по молекулярно-генетическим маркерам обещает перевести обработку биологического материала, в первую очередь массовых проб в экологии, на совершенно новый уровень.

Сравнение нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров не является исключительно эмпирическим занятием. Оно идет об руку с теорией молекулярной эволюции. В частности, теория указывает, что вслед за генетической изоляцией популяций, неважно по какой причине произошедшей, неизбежно начинается генетическая дивергенция, неуклонно усиливающаяся по ходу независимой эволюции. Сколько-нибудь продолжительная изоляция неизбежно приведет к различиям хотя бы в наиболее эволюционно переменных маркерных последовательностях. В дальнейшем будут приобретены различия и в более консервативных последовательностях. Например, прازیнофитовая водоросль “*Micromonas pusilla*”, массовый компонент пикопланктона, распространена всесветно и не обнаруживает в строении клеток в разных частях Мирового океана особенностей, позволяющих выделить разные виды. Но анализ нуклеотидных последовательностей маркерных генов культур, хранящихся в международных коллекциях (Šlapeta et al., 2006a), обнаруживает большое число генетически отличающихся в разной степени форм, в том числе симпатрических; с другой стороны, тождественные формы занимают гигантский ареал (от тихоокеанского побережья Канады до южного побережья Австралии). Степень различий позволяет оценить время

расхождения форм «морфовида» “*Micromonas pusilla*”. Для наиболее далеких форм это более 60 млн. лет, то есть немногим меньше времени расхождения семейств цветковых растений и отрядов млекопитающих. А на основании имеющихся в базах данных анонимных последовательностей из планктона различных областей Мирового океана, можно сделать еще один вывод: генетическое разнообразие форм “*Micromonas pusilla*” далеко не исчерпывается штаммами, хранящимися в коллекциях (Šlapeta et al., 2006a).

Не менее впечатляющий пример представляет разнообразие гетеротрофных жгутиконосцев бодонид (Excavata, Kinetoplastida). Среди них найдено две примечательных группы фактов: 1) наличие далеко разошедшихся линий в пределах «морфовидов»; 2) формы с идентичной морфологией, независимо возникшие в различных частях филогенетического дерева (Scheckenbach et al., 2006). Если первая группа расширяет наблюдения над другими таксонами, например, “*Micromonas pusilla*”, то вторая требует отдельного разбора. Для многоклеточных мы знаем о необратимости эволюции (часто именуемый также законом Долло). Одно из следствий закона Долло – запрет на неоднократное возникновение того же самого вида. Очевидно, в случае одноклеточных бедность морфологического диагноза приводит к недостаточной разрешающей способности систематики, к многочисленным ошибкам при определении видов по морфологическим признакам и видимому нарушению закона Долло.

Опираясь на работы, сочетающие выделение культур и их видовую идентификацию в рамках традиционной парадигмы с молекулярно-генетическим анализом, мы получаем основу для правильной оценки результатов анализа природных проб, выполненных только с применением технологий ДНК.

4. Таксоны высокого ранга в анонимных последовательностях

4.1. История “Marine alveolate Group”. Среди вопросов, наиболее естественных по отношению к анонимным нуклеотидным последовательностям генов рРНК, выделяется следующий вопрос: а есть ли среди этих последовательностей такие, что принадлежат неизвестным организмам? То есть новым, неизвестным ранее видам, классам, типам... В одной из ранних работ (Moon-van der Staay et al., 2001) из 35 клонов, полученных после амплификации и клонирования гена 18S рРНК из проб тихоокеанского пикопланктона (клеток размером менее 3 мкм), только два оказались практически идентичными (более 99% сходства) с 18S рРНК известных видов. Остальные в разной степени походили на известные последовательности, но не могли быть отнесены на момент публикации к какому-либо определенному виду. Конечно, одна из причин состояла в том, что далеко не для всех описанных видов (тогда, да и сейчас) известны последовательности 18S рРНК. Но 6 из 35 последовательностей не удалось отнести к какому-либо известному типу (Moon-van der Staay et al., 2001)! Одновременно, в том же номере журнала, в статье других авторов (López-García et al., 2001) были описаны сходные последовательности, найденные в пикопланктоне приполярной зоны Атлантического и Индийского океанов. Станции были взяты на разных глубинах, от поверхности до 3000 м. Стало ясно, что речь идёт о всесветно распространённом и богатом видами таксоне. Особенно удивительным казался факт близости новых организмов к панцирным жгутиконосцам – динофлагеллятам, но озадачивал малый размер, а также то, что они обнаруживались в значительном количестве и в афотической зоне, то есть вряд ли могли быть водорослями. Притом неизвестные организмы были гораздо богаче динофлагеллят представлены в клонотеках и отличались между собой в большей степени, чем известные динофлагелляты. Они получили условное название “Marine alveolate Group II” и “Marine alveolate Group I” (López-García et al., 2001). В дальнейшем

“Marine alveolate Group II”, сестринскую группу динокариотических панцирных жгутиконосцев, удалось идентифицировать с «динофлагеллятами» порядка Syndinales (Moon-van der Staay et al., 2001) – паразитами, главным образом, одноклеточных. Их видовое разнообразие и массовое присутствие в планктоне явилось полной неожиданностью и заставляет пересматривать экологическую роль прессы паразитов. “Marine alveolate Group I” – сестринская группа динофлагеллят, включая Syndinales, оставалась загадочной практически до прошлого года, когда были одновременно с применением микроскопической и молекулярной техники переисследованы *Duboscquella*, паразит инфузорий-тинтинид (Harada et al., 2007), и *Paradinium*, паразит веслоногих ракообразных (Skovgaard, Daugbjerg, 2008). Еще один представитель “Marine alveolate Group I” (Mori et al. 2007; Yuasa et al. 2007) тоже оказался известным видом, считавшимся паразитической динофлагеллятой – *Ichthyodinium chabelardi* (Hollande, Cachon, 1952), и тоже паразитом «одноклеточных» – икры пелагических рыб. Исследования ультраструктуры показали плезиоморфные черты в организации клеток *I. chabelardi* (Gestal et al., 2006). В частности, наличием псевдоконоида они более напоминают *Perkinsus* и споровиков, чем панцирных жгутиконосцев.

Таким образом, история “Marine alveolate Group” I и II оказывается весьма поучительной. Благодаря исследованиям проб ДНК из природных сообществ было обращено внимание на крупную группу – таксон протистов высокого ранга. Эти организмы не оказались новыми для науки, но их статус был, согласно новым данным, пересмотрен и повышен. Это стимулировало дополнительные исследования их морфологии, которые подтвердили высокий таксономический ранг и оказались важны для понимания эволюции Alveolata в целом. Из 500 ссылок в научной литературе на статьи (López-García et al., 2001; Moon-van der Staay et al., 2001) на конец 2009 г. (согласно данным ISI Web of Knowledge), заметная часть приходится на “Marine alveolate Group”. Пересмотрена экологическая роль этих целиком

паразитических одноклеточных, которые оказались неожиданно разнообразными и массовыми в различных сообществах (Moreira, López-García 2003; Lefèvre et al. 2008). Впрочем, количественные оценки, возможно, в будущем потребуют коррекции. Различная представленность в библиотеках ДНК и кДНК и некоторые другие наблюдения поддерживают гипотезу о непропорционально высокой копийности рибосомных оперонов в их геномах по сравнению с «микроводорослями» *Pelagomonas*, *Ostreococcus*, *Micromonas* и другими представителями пикопланктона (Massana et al., 2008). Это может объяснить «избыточную» долю “Marine alveolate Group” в клонотеках ДНК. Однако, если оценки численности и могут быть пересмотрены и скорректированы, то оценки высокого разнообразия являются абсолютными и бесспорными.

Подобным образом последовательности рРНК ряда других таксонов высокого ранга впервые были получены из проб природных субстратов. На момент их обнаружения они не были идентифицированы и рассматривались как «независимые эволюционные линии». Первоначально неидентифицированные рРНК из одной только работы (Dawson, Pace, 2002) были позднее отнесены к амебам, грегариам (Berney et al., 2004), кольподеллам (Leander et al., 2003), архигрегариам (Leander et al. 2006), а часть последовательностей остается до сих пор неидентифицированными. Вначале были определены в природных пробах как неидентифицированные, а затем идентифицированы последовательности катаблефарид (Šlapeta et al., 2006a) и некоторых других протистов.

Расширение работ по рРНК природных образцов выдвинуло задачу их обобщения в отношении перспектив обнаружения новых эукариотических групп высокого таксономического ранга, «царств» (Berney et al., 2004). Более тщательный анализ первичных данных за счет поиска химер и использования более совершенных программ построения филогенетических деревьев для правильного размещения на древе высоко дивергированных последовательностей, а также расширения таксономической выборки в базах

данных, привел к пересмотру начальных оценок в сторону их уменьшения. Так, если первоначально среди 289 различных последовательностей (филотипов) авторы относили 9,7% к «новым» для науки линиям эукариотов, то повторный анализ выявил в них 13,8% химерных последовательностей, и только 3,5% оставались не идентифицированными до типа, представляя собой потенциально «новые» для науки группы (рис. 3). Часть из них сохраняет этот статус до настоящего времени.

4.2. Таксоны, первоначально обнаруженные в анонимных рРНК. В предыдущем разделе мы рассмотрели некоторые примеры, когда нуклеотидные последовательности генов рРНК представителей известных типов или классов были впервые получены из природных субстратов, а не известных, определенных традиционными методами лабораторных культур. В рассмотренных случаях это были, как правило, новые виды, или даже неизвестные науке семейства. Но более интересными кажутся находки таких организмов, которых протистологи никогда не видели в микроскоп – представителей новых для науки типов. Их поиск оказывается занимательной «охотой на микробов», пример которой можно видеть в исследовании глубоководных холодных метановых сипов вблизи Японии (Takishita et. al., 2007). Стерильно отобранные пробы из этих обедненных кислородом местообитаний авторы разделяли на две части, одну из которых использовали для выделения ДНК, а другую – для создания накопительных культур на двух типах сред. Накопительные культуры выдерживали 10 суток в анаэробных условиях при 4 °C.

Оказалось, что в накопительной культуре на среде 5% PYNFN (ATCC) доминирует гетеротрофный жгутиконосец, последовательность рРНК которого практически идентична таковой, полученной из природных проб.

Микроскопическое исследование выявило у клеток признаки внешнего строения, свойственные представителям Excavata (глубокую вентральную бороздку, проксимально расширенный задний жгутик и др.).

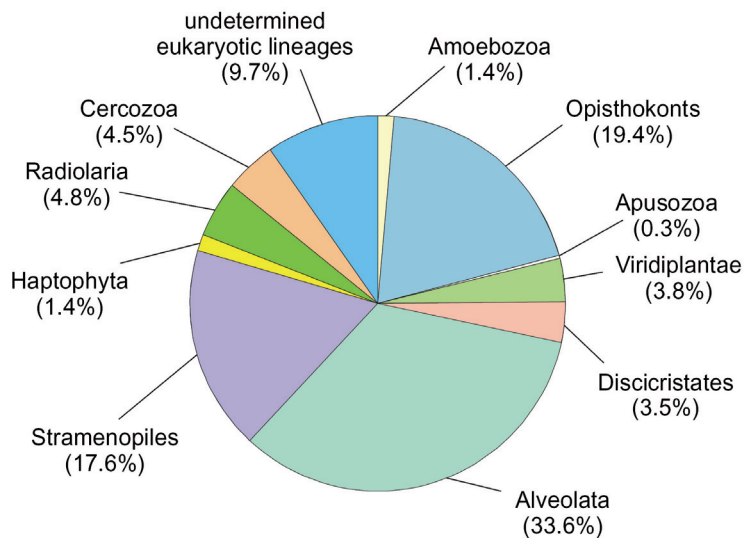
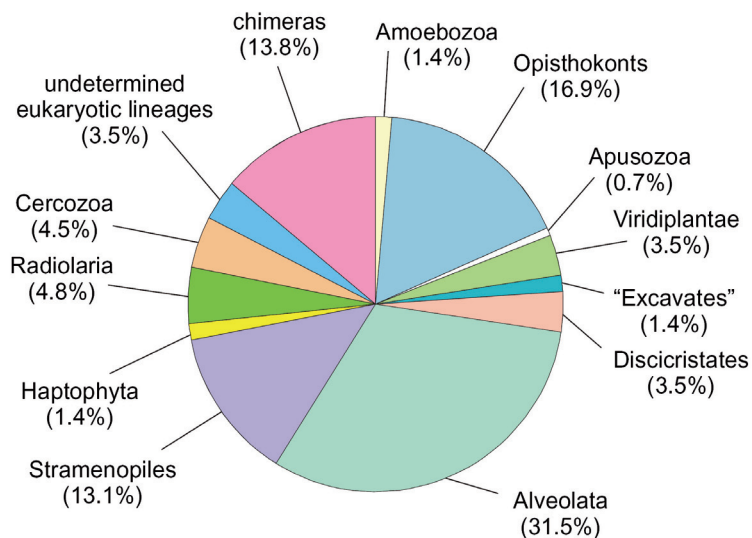
A**B**

Рис. 3. Соотношение различных групп эукариотов в пробах рДНК из природных субстратов на основании оригинальных оценок (А) и по результатам переисследования оригинальных данных (В). Из: (Berney et al., 2004).

Филогенетический анализ последовательностей 18S рРНК помещает выделенный организм к особую, изолированную кладу Excavata, сестринскую ретортамонадидам и карпедиемонадидам. Ранее 18S рДНК ее представителей была обнаружена в осадке гидротерм в Калифорнийском заливе (Edgcomb et. al., 2002). Такишита с соавт. (Takishita et. al., 2007) не описали выделенного жгутиконосца, обещая сделать это в отдельной работе, однако снабдили статью его фотографиями.

Находки не ограничиваются новыми для науки классами. Давно идет «охота» на «морских stramenoplies», MUST (для обзора см.: Massana et al., 2004), на которых может приходиться до 20% последовательностей клонотек, полученных из кДНК пикопланктона (Not et al., 2009). Недавно представлены доказательства филогенетической обособленности неизвестных пикопланктонных организмов, получивших наименование picobiliphytes (Not et al., 2007) или biliphytes (Cuvelier al., 2008). На филогенетических деревьях 18S рРНК они оказываются сестринской группой криптофитовых, хотя статистическая поддержка такой группировки невысокая (Cuvelier al., 2008). То есть их ранг примерно соответствует рангу криптофитовых и гаптофитовых. Пока что эти организмы идентифицированы по последовательностям 18S рРНК и гибридизацией *in situ* со специфическими зондами (FISH), изучен их пигментный состав, свидетельствующий в пользу их способности к фотосинтезу, нанесены на карту географические координаты мест их нахождения (атлантика, пацифика, полярные и тропические воды), изучена приуроченность к теплым (30 °C) и холодным (5°C) водным массам. Picobiliphytes или biliphytes пока остаются не выделенными в культуру и не описанными организмами.

Другие, более редко встречающиеся в природе чем picobiliphytes представители изолированных групп на филогенетических деревьях 18S рРНК еще ждут приговора, являются ли они членами неизвестных науке клад или дериватами известных. И список таких кандидатов продолжает

пополняться, несмотря на существенное расширение референсной базы данных.

Список литературы

1. Беклемишев В.Н. Методология систематики (рукопись 1928 г.). М.: КМК Ltd., 1994. 250 с.
2. Лебединский А.В., Черных Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А. 2007. Геносистематика микроорганизмов термальных местообитаний // Биохимия. Т. 72. № 12. С. 1594–1609.
3. Лухтанов В.А., Кузнецова В.Г. Молекулярно-генетические и цитогенетические подходы к проблемам видовой диагностики, систематики и филогенетики // Журн. общ. биологии. 2009. Т 70. № 5. С. 415–437.
4. Натальин П. 2008. 454-секвенирование (высокопроизводительное пиросеквенирование ДНК) // Биомолекула. (<http://biomolecula.ru/content/214>)
5. Старынкевич К.Д. Строение жизни. Прага: Politika, 1931. 36 с.
6. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журн. общ. биологии. 2009. Т 70. № 4. С. 296–315.
7. Andersson A.F., Lindberg M., Jakobsson H., Bäckhed F., Nyrén P., Engstrand L. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing // PLoS One. V. 3. № 7. P. e2836.
8. Berney C., Fahrni J., Pawlowski J. 2004. How many novel eukaryotic 'kingdoms'? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys // BMC Biol. V. 2. P. 13.
9. Cannone J.J., Subramanian S., Schnare M.N., Collett J.R., D'Souza L.M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L.V., Muller K.M., Pande N., Shang Z., Yu N., Gutell R.R. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database

- of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs // BMC Bioinformatics. V. 3. P. 2.
10. *Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M.* 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. V. 37. Database issue. D141–D145.
 11. *Cuvelier M.L., Ortiz A., Kim E., Moehlig H., Richardson D.E., Heidelberg J.F., Archibald J.M., Worden A.Z.* 2008. Widespread distribution of a unique marine protistan lineage // Environ. Microbiol. V. 10. № 6. P. 1621–1634.
 12. *Dawson S.C., Pace N.R.* 2002. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. № 12. P. 8324–8329.
 13. *Dalevi D., DeSantis T.Z., Fredslund J., Andersen G.L., Markowitz V.M., Hugenholtz P.* 2007. Automated group assignment in large phylogenetic trees using GRUNT: GRouping, Ungrouping, Naming Tool // BMC Bioinformatics. V. 8. № 1. P. 402.
 14. *DeSantis T.Z., Dubosarskiy I., Murray S.R., Andersen G.L.* 2003. Comprehensive aligned sequence construction for automated design of effective probes (CASCADE-P) using 16S rDNA // Bioinformatics. V. 19. № 12. P. 1461-1468.
 15. *DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Phan R., Andersen G.L.* 2006a. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes // Nucleic Acids Res. V. 34. Web Server issue. W394-W399.
 16. *DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L.* 2006b. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // Appl. Environ. Microbiol. V. 72. № 7. P. 5069–5072.

17. Dunbar J., Barns S.M., Ticknor L.O., Kuske C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 68. № 6. P. 3035–3045.
18. Edgcomb V.P., Kysela D.T., Teske A., de Vera Gomez A., Sogin M.L. 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 99. № 11. P. 7658–7662.
19. Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L., Haynes M., Breitbart M., Peterson D.M., Saar M.O., Alexander S., Alexander E.C. Jr, Rohwer F. 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology // *BMC Genomics.* V. 7. P. 57.
20. Gestal C., Novoa B., Posada D., Figueras A., Azevedo C. 2006. *Perkinsoides chabelardi* n. gen., a protozoan parasite with an intermediate evolutionary position: possible cause of the decrease of sardine fisheries? // *Environ. Microbiol.* V. 8. № 6. P. 1105–1114.
21. Hamady M., Walker J.J., Harris J.K., Gold N.J., Knight R. 2008. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex // *Nat. Methods.* V. 5. № 3. P. 235–237.
22. Harada A., Ohtsuka S., Horiguchi T. 2007. Species of the parasitic genus *Duboscquella* are members of the enigmatic Marine Alveolate Group I // *Protist.* V. 158. P. 337–347.
23. Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Biol. Sci.* V. 270. P. 313–321.
24. Hollande A., Cachon J. 1952. Un parasite des oeufs de sardine: l'*Ichthyodinium chabelardi*, nov. gen. nov. sp. (Péridinien parasite) // *C. R. Acad. Sci. Paris.* V. 235. S. 976–977.
25. Huber J.A., Mark Welch D.B., Morrison H.G., Huse S.M., Neal P.R., Butterfield D.A., Sogin M.L. 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere // *Science* 318:97-100.
26. Keijser B.J., Zaura E., Huse S.M., van der Vossen J.M., Schuren F.H., Montijn R.C., ten Cate J.M., Crielaard W. 2008. Pyrosequencing analysis of

- the oral microflora of healthy adults // *J. Dent. Res.* V. 87. № 11. P. 1016–1020.
27. *Leander B.S., Kuvardina O.N., Aleshin V.V., Myl'nikov A.P., Keeling P.J.* 2003. The free-living ancestry of apicomplexans: phylogeny of colpodellids (Alveolata) as inferred from small subunit rDNA // *J. Eukaryot. Microbiol.* V. 50. № 5. P. 334–340.
28. *Leander B.S., Lloyd S.A.J., Marshall W., Landers S.C.* 2006. Phylogeny of Marine Gregarines (Apicomplexa) – *Pterospira*, *Lithocystis* and *Lankesteria* – and the origin(s) of coelomic parasitism // *Protist.* V. 157. № 1. P. 45–60.
29. *Lefèvre E., Roussel B., Amblard C., Sime-Ngando T.* 2008. The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes reveals high occurrence of putative parasitoids in the plankton // *PLoS ONE.* V. 3. P. E2324.
30. *López-García P., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C., Moreira D.* 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton // *Nature.* V. 409. № 6820. P. 603–607.
31. *Massana R., Castresana J., Balagué V., Guillou L., Romari K., Groisillier A., Valentin K., Pedrós-Alió C.* 2004. Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 70. № 6. P. 3528–3534.
32. *Massana R., Karniol B., Pommier T., Bodaker I., Bèjà O.* 2008. Metagenomic retrieval of a ribosomal DNA repeat array from an uncultured marine alveolate // *Environ. Microbiol.* V. 10. № 5. P. 1335–1343.
33. *Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., Sogin M.L.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions // *Gene.* 1988. V. 71. № 2. P. 491–499.
34. *Miller S.R., Strong A.L., Jones K.L., Ungerer M.C.* 2009. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 75. № 13. P. 4565–4572.

35. Moon-van der Staay S.Y., De Wachter R., Vaolot D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity // Nature. V. 409. № 6820. P. 607–610.
36. Moreira D., López-García P. 2003. Are hydrothermal vents oases for parasitic protists // Trends Parasitol. V. 19. P. 556–558.
37. Mori K., Yamamoto K., Teruya K., Shiozawa S., Yoseda K., Sugaya T., Shirakashi S., Itoh N., Ogawa K. 2007. Endoparasitic dinoflagellate of the genus *Ichthyodinium* infecting fertilized eggs and hatched larvae observed in the seed production of leopard coral grouper *Plectropomus leopardus* // Fish Pathology. V. 42. P. 49–57.
38. Not F., Valentin K., Romari K., Lovejoy C., Massana R., Töbe K., Vaolot D., Medlin L.K. 2007. Picobiliphytes: a marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes // Science. V. 315. № 5809. P. 253–255.
39. Not F., del Campo J., Balagué V., de Vargas C., Massana R. 2009. New Insights into the Diversity of Marine Picoeukaryotes // PLoS ONE. V. 4. № 9. e7143.
40. Pruesse, E., Quast C., Knittel K., Fuchs B., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F. O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB // Nucleic Acids Res. V. 35. № 21. P. 7188–7196.
41. Scheckenbach F., Wylezich C., Mylnikov A.P., Weitere M., Arndt H. 2006. Molecular comparisons of freshwater and marine isolates of the same morphospecies of heterotrophic flagellates // Appl. Environ. Microbiol. V. 72. № 10. P. 6638–6643.
42. Skovgaard A., Daughjerg N. 2008. Identity and Systematic Position of *Paradinium poucheti* and Other *Paradinium*-Like Parasites of Marine Copepods Based on Morphology and Nuclear-Encoded SSU rDNA // Protist. V. 159. P. 401–413.

43. Šlapeta J., López-García P., Moreira D. 2006a. Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes // *Mol. Biol. Evol.* V. 23. № 1. P. 23–29.
44. Šlapeta J., López-García P., Moreira D. 2006b. Present Status of the Molecular Ecology of Kathablepharids // *Protist.* V. 157. № 1. P. 7–11.
45. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Mark Welch D., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere” // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 103. № 32. P. 12115–12120.
46. Sonneborn T.M. 1975. The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species // *Trans. Am. Micro. Soc.* 94. № 2. P. 155–178.
47. Takishita K., Yubuki N., Kakizoe N., Inagaki Y., Maruyama T. 2007. Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures // *Extremophiles.* V. 11. № 4. P. 563–576.
48. Van de Peer Y., De Rijk P., Wuyts J., Winkelmans T., De Wachter R. 2000. The European small subunit ribosomal RNA database // *Nucleic Acids Res.* V. 28. № 2. P. 175–176.
49. von Wintzingerode F., Göbel U.B., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis // *FEMS Microbiol. Rev.* V. 21. № 3. P. 213–229.
50. Yuasa K., Kamaishi T., Mori K., Hutapea J.H., Permana G.N., Nakazawa A. 2007. Infection by a protozoan endoparasite of the genus *Ichthyodinium* in embryos and yolk-sac larvae of yellowfin tuna *Thunnus albacares* // *Fish Pathology.* V. 42. P. 59–66.

Молекулярная экология микроорганизмов:

факты, проблемы и перспективы

Н.Л. Белькова^{1,2}, Н.Н. Деникина¹

1 - *Лимнологический институт СО РАН*

2 - *Иркутский государственный университет*

В настоящее время можно с уверенностью говорить о становлении нового направления в биологической науке – молекулярной экологии микроорганизмов, обусловленном совершенствованием молекулярно-биологических методов и их повсеместным внедрением в технологические процессы. Развитие молекулярной экологии имеет революционный характер, оказывая заметное влияние не только на классическую микробиологию, но и системную экологию в целом. Быстрое накопление молекулярных данных о разнообразных микроорганизмах позволило в сжатые сроки описать множество некультивируемых групп и открыло широкие возможности для исследований функциональных свойств бактерий без культивирования, непосредственно в природном образце (Giovannoni et al., 1990; Gloeckner et al., 2000; Rappé, Giovannoni, 2003; Alonso, Pernthaler, 2006 и др.). Современные методы молекулярной биологии позволяют не только изучать генетическое разнообразие представителей различных природных сообществ, независимо от их способности к культивированию, но и исследовать функционирование определенных физиологических групп по экспрессии соответствующих генов и генетический потенциал микробного сообщества в целом (Duprer, O'Malley, 2007; Bertin et al., 2008; Cardenas, Tiedje, 2008 и др.).

Начало микробиологии как науки определяется первым описанием Антони Ван Левенгуком бактерий, которых он наблюдал в простейший микроскоп (1674–1683 гг.). Описательный период в микробиологии продолжался почти 200 лет, вплоть до середины XIX столетия, когда научились выращивать микроорганизмы в лабораторных условиях. С конца XIX века начинается успешное и быстрое развитие микробиологии: доказано,

что одни микроорганизмы являются возбудителями заболеваний человека, животных и растений, другие – участвуют в процессах брожения и гниения пищевых продуктов, третьи способны получать энергию при окислении неорганических соединений, четвертые способны фиксировать молекулярный азот. Изучение роли микроорганизмов в различных биогеохимических процессах положило начало развитию физиологии и биохимии бактерий, тщательному изучению их структурной организации (Современная микробиология, 2005).

Развитие классической бактериологии, занимающейся изучением бактерий после выделения в чистой культуре, показало необыкновенную физиологическую и биохимическую универсальность микроорганизмов и сделало актуальными такие экологические задачи, как выяснение роли микроорганизмов в природных экосистемах и степень их участия в круговороте веществ. Термин «экология» ввел немецкий биолог Эрнст Геккель (1834–1919). Первоначально сформулированное как «наука о всесторонних отношениях организма с окружающей средой...», его определение остается почти без изменений. Для использования в микробной экологии основные термины уточняются (экосистема, экониша, пищевая цепь, микроокружение), добавлены новые понятия: автохтонные и аллохтонные микроорганизмы, разработаны основополагающие методические подходы для изучения бактерий *in situ* (непосредственно в природных местах обитания). Основоположниками этих исследований стали русские ученые С.Н. Виноградский, Н.Г. Холодный, Б.В. Перфильев и др. Экология микроорганизмов становится наукой, использующей самые современные методы физико-химического анализа, изучающей взаимоотношения микроорганизмов с их биотическим и абиотическим окружением (Современная микробиология, 2005; Пиневиц, 2007).

Таким образом, в результате активного развития классической микробиологии и микробной экологии были открыты уникальные свойства микроорганизмов:

- ✓ Микроорганизмы ответственны за *формирование и сохранение нашей биосферы*. Они создали кислородные условия, существенные для происхождения и выживания высших организмов.
- ✓ *Глобальные биогеохимические циклы* осуществляются благодаря геохимической активности микроорганизмов. Например, полные циклы азота и серы, восстановление и окисление металлов были бы невозможны без активности бактерий.
- ✓ Прокариотические организмы показывают необыкновенно высокую *физиологическую и биохимическую универсальность*. Они используют восстановленные неорганические компоненты в качестве источника энергии для хемолитотрофного метаболизма или окисленные неорганические компоненты для анаэробного дыхания. Некоторые метаболические пути (специфическая ферментация, фиксация азота, образование метана, аноксигенный фотосинтез) или биосинтез некоторых вторичных метаболитов (антибиотики и токсины) описаны только для прокариотических организмов. Кроме того, все существующие в природе и большинство искусственно созданных человеком материалов разрушаются микробами. Таким образом, метаболическое, физиологическое и генетическое разнообразие прокариотических микроорганизмов намного превышает то, которое обнаружено среди высших организмов.
- ✓ *Крайние пределы жизни* также определены прокариотическими организмами. Характерными и зачастую единственными обитателями мест с экстремальными условиями являются именно микроорганизмы: горячие источники (температуры до 100°C), толща льда (4 километра, центр Восточной Антарктики), агрессивные среды с крайне кислыми или щелочными значениями pH, высоконасыщенные солевые растворы.
- ✓ Присутствие микробных, в частности *бактериальных, эндосимбионтов* является существенным фактором выживания большинства высших

организмов. Симбионты проводят важные биохимические реакции для своих эукариотических хозяев, например, биосинтез незаменимых аминокислот, витаминов или деградация некоторых макромолекул (лигнин, хитин, целлюлоза). Образ жизни термитов полностью детерминирован требованиями симбиотических микроорганизмов, населяющих их желудочно-кишечный тракт (Hongoh et al., 2008). А метаболиты сульфид-окисляющих бактериальных симбионтов для некоторых морских червей вообще являются единственным источником питания (Woyke et al., 2006).

Следующим очевидным фактом является понимание таких особенностей микроорганизмов, как их невероятно высокая общая численность и биомасса. Во всех средах обитания прокариоты превосходят по численности эукариот (Whitman et al., 1998; Schleifer, 2004). Например, организм среднестатистического человека состоит из 10^{13} собственных клеток (эукариотических) и содержит 10^{14} – 10^{15} бактериальных клеток (прокариотических). Последние оценки показали, что по биомассе прокариоты превосходят эукариот (Whitman et al., 1998): около 500 миллиардов тонн углерода связано в прокариотах (Табл. 1), что составляет около 50% от общей массы углерода. Прокариотическое происхождение имеют и около 90% азота и фосфора.

Таблица 1. Оценочное количество связанного углерода, азота и фосфора в широко распространенных прокариотах (Whitman et al., 1998).

Элемент	Количество элемента, связанного в прокариотах (в тоннах)	В сравнении с количеством, связанного элемента в растениях
углерод	$3.5\text{--}5.5 \times 10^{11}$	60–100%
азот	$0.9\text{--}1.4 \times 10^{11}$	в 10 раз больше
фосфор	$0.9\text{--}1.4 \times 10^{10}$	в 10 раз больше

Интересны оценки палеогеологов о том, что прокариоты, детектируемые в древних осадках, могут быть ответственны за продукцию не менее одной трети биомассы на Земле. Таким образом, исследование любой экосистемы невозможно без знания разнообразия и понимания функционирования населяющих ее микробных сообществ.

Развитие молекулярной биологии в XX веке, одним из основных объектов исследований которой стали лабораторные бактериальные штаммы, ознаменовало рождение и расцвет новых направлений исследований в биологической науке, таких как геновая инженерия, молекулярная эволюция и молекулярная экология. Мощным толчком для развития всех этих направлений стала разработка метода полимеразной цепной реакции. Этот пример наглядно продемонстрировал, насколько быстрыми темпами может идти развитие биологической науки с возникновением принципиально новых технологий. В 1971 году Klenpe с соавторами (Klenpe et al., 1971) впервые описали основные принципы ПЦР и состав реакционной смеси для получения копий ДНК. В 1983 году Kary Mullis предложил метод многократного копирования в пробирке определенных участков ДНК в результате повторяющихся температурных циклов. В 1985 году американскими учеными было впервые продемонстрировано возможности этого метода для идентификации микроорганизмов (Lane et al., 1985) и изучения микробного сообщества в природных образцах без культивирования (Stahl et al., 1985). Эти пионерные исследования носили прогрессивный характер: был предложен принципиально новый подход для изучения микробной экологии – филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей рибосомных генов. В качестве целевых фрагментов используют гены рибосомных РНК (рис.1). Они имеют ряд преимуществ перед другими нуклеотидными последовательностями в плане их использования для изучения биоразнообразия. Эти гены имеются во всех организмах, они высококопийны и содержат как очень консервативные, так и переменные фрагменты (рис. 2).



Рис. 1. Кассета рибосомных генов бактерий.

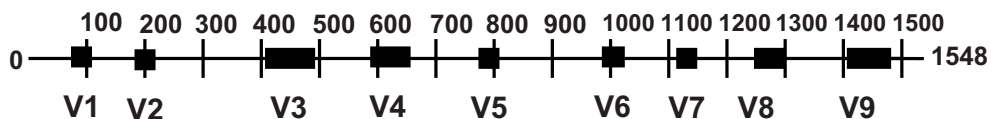


Рис. 2. Структура гена 16S рибосомной РНК. Vn отмечены вариабельные участки.

Высоко консервативные последовательности используют в качестве мишеней при оценке общей численности организмов, а вариабельные могут служить сайтами узнавания для зондов, специфичных к конкретным группам или родам при видовой идентификации микроорганизмов. В серии исследований было показано, что разнообразие микроорганизмов, детектируемое молекулярно-генетическими методами, намного больше, чем культивируемое на известных питательных средах. Постепенно были выделены целые кластеры нуклеотидных последовательностей, характерных для представителей самых разнообразных микробных сообществ. К концу XX века в этих направлениях исследователи сформулировали целый спектр новых целей и задач, а способствовало этому мощное развитие приборного оснащения и реагентной базы. Были предприняты успешные попытки подбора селективных условий для культивирования конкретных микроорганизмов и подтверждено существование новых таксономических линий. Стало очевидно, что некультивируемые прокариоты представляют огромный *генетический и биотехнологический потенциал* и, следовательно, важный источник новых продуктов и процессов.

Таким образом, к началу XXI века еще одним очевидным фактом стало огромное генетическое разнообразие фенотипов в микробных сообществах. При этом растущие возможности молекулярной биологии – анализ рибосомных генов тотальной ДНК, выделенной непосредственно из микробных сообществ, – со всей очевидностью продемонстрировали разрыв между спектром культивируемых микроорганизмов и их истинным разнообразием в природных местах обитания, а методические подходы генной инженерии изменили наш взгляд на то, как можно изучать функционирование микробных сообществ и отдельных физиологических групп. Кроме того, актуальным стал вопрос о постулате, который был догмой для микробиологов в начале XX века: для характеристики микроорганизма он должен быть выделен в лабораторную культуру. Современный уровень развития методов молекулярной биологии и генной инженерии позволил молекулярной экологии микроорганизмов сформироваться в виде самостоятельного направления исследований, оставив неизменной основную цель – комплексное изучение сообществ *in situ*. Он позволил решить задачу выявления разнообразия всех представителей различных природных сообществ (независимо от их способности к культивированию) по структурам рибосомных генов, исследование функционирования определенных физиологических групп по экспрессии соответствующих генов и изучение генетического потенциала сообществ в целом (рис. 3).

Основные направления молекулярно-генетических исследований остаются неизменными вот уже 20 лет, только реализуются они в более широких границах:

- Ревизия бактериальных видов и родов и установление эволюционных связей.
- Структурно-функциональное изучение природных микробных сообществ *in situ*, без культивирования.



Рис. 3. Основные задачи молекулярной экологии микроорганизмов.

Методология молекулярно-генетического подхода к анализу природных микробных сообществ представлена на рисунке 4. Целевыми объектами молекулярных исследований являются нуклеиновые кислоты. Используя в качестве анализируемых молекул ДНК (РНК), можно уверенно изучать состав и разнообразие всех организмов, которые находятся в микробном сообществе (рис. 4). Однако всегда в этом случае возникают два вопроса: кто находится в данный момент времени в микробном сообществе и кто из присутствующих микроорганизмов действительно живет, размножается и реализует свой биохимический потенциал.

Прямые исследования, основанные на анализе ДНК, способны ответить только на первый вопрос. Ответ на второй вопрос предполагает либо использование РНК в качестве молекулы-мишени, либо применение дополнительных методов селективной инактивации внеклеточной ДНК, которая появляется в среде в первую очередь в результате разрушения отмирающих бактериальных клеток.

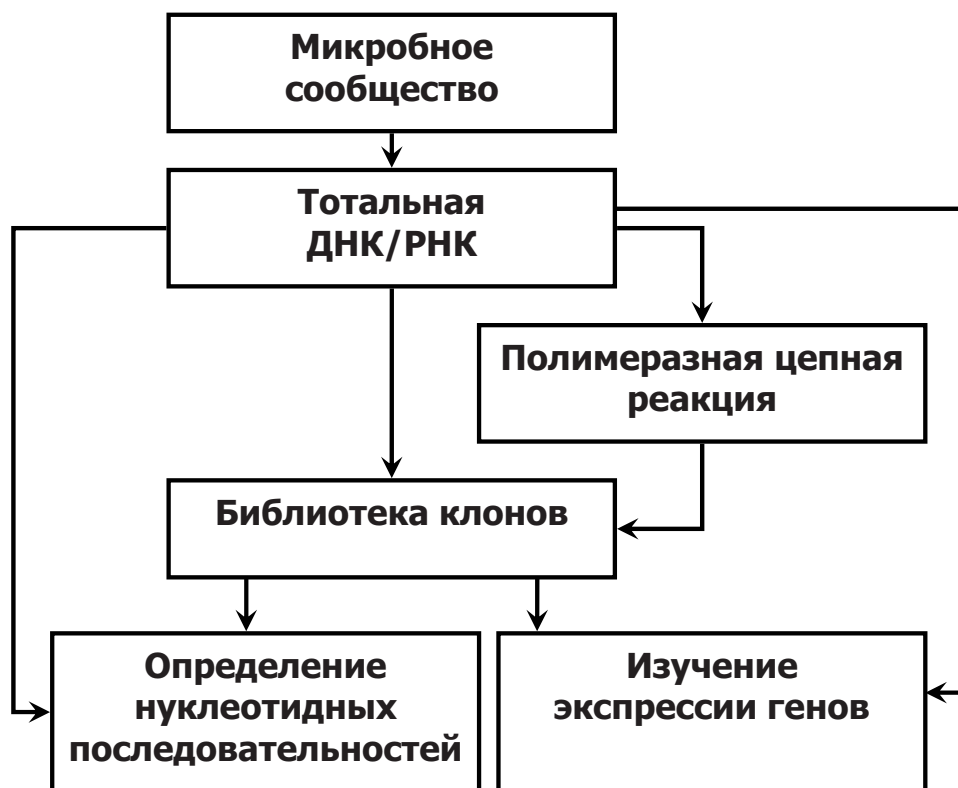


Рис. 4. Современная методология молекулярно-генетического анализа микробных сообществ.

На следующем этапе создается библиотека клонов либо непосредственно из тотальной ДНК, либо после ПЦР фрагмента известного гена. Дальнейший структурно-функциональный анализ позволяет проводить поиск белок-кодирующих генов, изучать их экспрессию и получать нуклеотидные последовательности, далее используемые для установления филогенетического положения или для выяснения эволюционных связей среди разных таксономических групп микроорганизмов.

Развиваясь высокими темпами, молекулярная микробиология сначала поставила под сомнение уверенность микробиологов начала прошлого века в том, что культивируемые на селективных питательных средах микроорганизмы отражают истинную картину природного разнообразия. В

настоящее время подвергается сомнению следующий постулат классической микробиологии, утверждающий, что «ни один организм не может быть классифицирован, не будучи культивированным» (определитель Берги). Большинство фантомных филогенетических линий бактерий, первоначально определенных только по нуклеотидным последовательностям фрагмента гена малой субъединицы рРНК, год за годом находят своих культивируемых представителей, и их классификация обретает традиционные очертания.

С конца прошлого века молекулярные микробиологи предпринимают активные попытки описать филогенетическое разнообразие микробных сообществ экзотических и обычных местообитаний – океанической поверхности, глубоких морских вулканов, горячих источников, почвы, кишечника человека и животных. Много новых филогенетических линий определено только на основании этих молекулярных данных. Следующим требованием развития молекулярной экологии стало разъяснение функций тех новых фило типов, которые были получены и подтверждение того, что они представляют действительно новые виды, рода или линии прокариотической жизни. Решение этих задач буквально за 50 лет зародило и создало новые технологии, включая метагеномику (рис. 5). В последние годы изучение некультивируемых микроорганизмов вышло за рамки простого вопроса: «**Кто** находится там?» и приступило к поиску ответа на более комплексный: «**Кто** конкретно **что** делает?». Результаты определения некультивируемых микроорганизмов заслуживают экспертизы. Один из таких результатов, метагеномика, формирует новый облик микробиологии. Метагеномика уже открыла новые просторы для исследования беспрецедентного анализа геномной гетерогенности и эволюции в контексте природных экосистем и обеспечивает доступ к гораздо большему микробному разнообразию, чем может быть получено в чашке Петри.

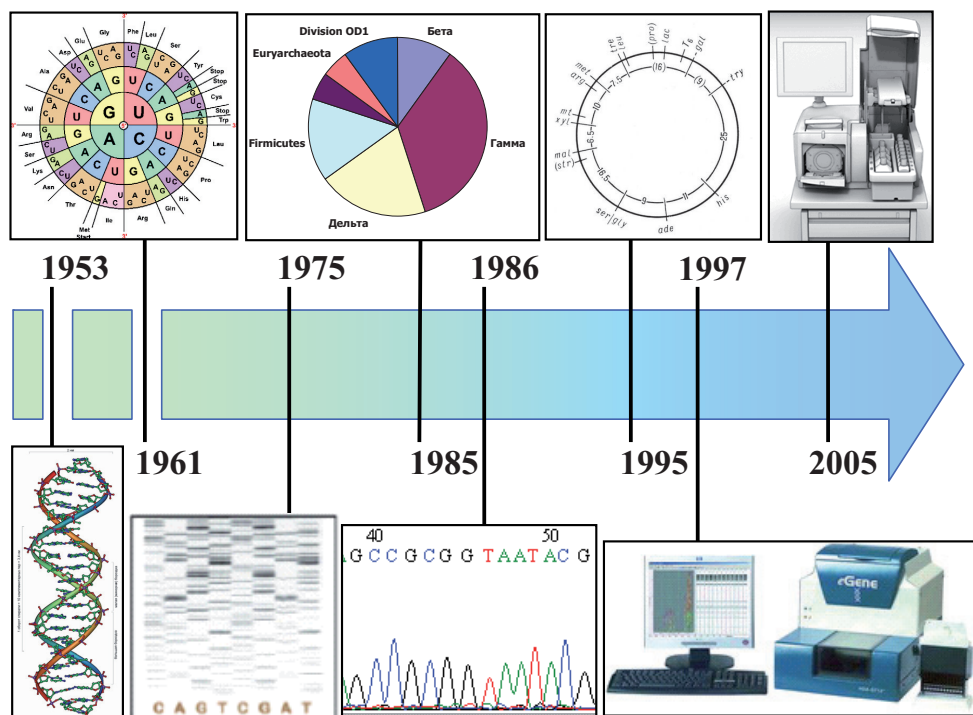


Рис. 5. Основные вехи в истории геномики микроорганизмов и секвенирования ДНК (по Bertin et al., 2008, с модификациями): 1953 – открытие двойной спирали ДНК, 1961 – первые шаги в расшифровке генетического кода, 1975 – разработка метода Сэнгера (метод «обрыва цепи»), 1985 – первые работы по изучению микробных сообществ с помощью ПЦР, 1986 – применение флуоресцентных красителей для повышения чувствительности секвенирования, 1995 – расшифровка первого генома бактерий *Haemophilus influenzae*, 1997 – развитие капиллярного электрофореза и производство автоматических секвенаторов, 2005 – разработка метода пиросеквенирования и производство пиросеквенаторов.

Перспективы развития молекулярной экологии микроорганизмов можно связать, в первую очередь, с развитием методической базы:

(1) Совершенствование методов пробоотбора и первичной пробоподготовки. Необходимо проводить селективную детекцию микроорганизмов разного физиологического статуса. Известно, что в природной микробной популяции бактериальные клетки могут находиться в разном физиологическом состоянии. Это могут быть как живые клетки,

метаболически активные или неактивные (покоящиеся – резистентные или споры), так и мертвые клетки.

(2) Новые методы работы с тотальной ДНК: создание метагеномных библиотек непосредственно из тотальной ДНК без амплификации целевых генов или секвенирование тотальной ДНК из природных микробных сообществ без амплификации и клонирования целевых генов. Эти данные позволяют изучить генетический потенциал микроорганизмов, населяющих данную экосистему. Сравнение экологических и генетических данных может дать важные звенья в цепочку протекающих в экосистеме биогеохимических превращений, в которых принимают участие микроорганизмы.

(3) Решение биоинформатических задач нового уровня. Это создание нового программного обеспечения для анализа последовательностей из метагеномных библиотек и полных геномов микроорганизмов. А также создание интегрированных баз данных, содержащих генетическую, экологическую и географическую информацию о микроорганизмах или последовательностях, полученных молекулярными методами. Развитие биогеографии (филогеографии) микроорганизмов.

(4) Новые методы использования биоинформационных данных. Использование микрочипов ДНК для идентификации микроорганизмов и микрочипов мРНК для анализа их функционального разнообразия. Особое внимание необходимо уделить их специфичности и чувствительности. Возможно изучение генной экспрессии некультивируемых организмов непосредственно в природных образцах, если будет увеличена специфичность и чувствительность метода.

(5) Разработка новых подходов к культивированию пока еще некультивируемых микроорганизмов, в том числе создание соответствующего инструментария и аппаратной базы.

(6) Современные экологические исследования будут продолжены, однако с помощью методов, позволяющих с высоким разрешением проводить анализы микробной активности *in situ*.

Несомненно, что эти исследования имеют как большое фундаментальное значение, так и огромную практическую значимость. Новые знания о микробном разнообразии и функционировании микробных сообществ имеют как экологическое, так и экономическое значение и выгода от их использования очевидна. Эти знания дадут новые инструменты как для биоремедиации и биоиндикации, так и для множества отраслей хозяйственной деятельности: химической и пищевой промышленности, медицины и ветеринарии. Молекулярная экология микроорганизмов в настоящее время несомненно является одним из базовых направлений научных исследований, проводимых с целью изучения и сохранения биоразнообразия экосистем всех уровней в целом.

Список литературы

1. *Пиневич А.В.* Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3-х т. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2007.
2. *Современная микробиология.* Прокариоты: в 2-х т. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005.
3. *Alonso C., Pernthaler J.* Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. // *Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 8. P. 2022 – 2030.
4. *Bertin P.N., Medigue C., Normand P.* Advances in environmental genomics: towards an integrated view of micro-organisms and ecosystems. // *Microbiology.* 2008. Vol. 154. P. 347 – 359.
5. *Cardenas E., Tiedje J.M.* New tools for discovering and characterizing microbial diversity. // *Curr. Opinion in Biotech.* 2008. Vol. 19. P. 544 – 549.
6. *Duprer J., O'Malley M.A.* Metagenomics and biological ontology. // *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.* 2007. Vol. 38. P. 834 – 846.
7. *Glockner O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., Amann R.* Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including

- an abundant group of Actinobacteria. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. No. 11. P. 5053 – 5065.
8. *Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G.* Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. // *Nature.* 1990. Vol. 345. P. 60 – 63.
 9. *Hongoh Y., Sharma V. K., Prakash T., Noda S., Toh H., Taylor T.D., Kudo T., Sakaki Y., Toyoda A., Hattori M., Ohkuma M.* Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. // *Science.* 2008. V. 322. P. 1108 – 1109.
 10. *Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G.* Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 56. P. 341 – 361.
 11. *Lane D.J., Stahl D.A., Olsen G.J., Heller D.J., Pace N.R.* Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 163. P. 75 – 81.
 12. *Rappé M.S., Giovannoni S.J.* The uncultured microbial majority. // *Ann. Rev. Microbiol.* 2003. Vol. 57. P. 369 – 394.
 13. *Schleifer K.-H.* Microbial diversity: facts, problems and prospects. // *System. Appl. Microbiol.* 2004. Vol. 27. P. 3 – 9.
 14. *Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R.* Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. Vol. 49. P. 1379 – 1384.
 15. *Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J.* Prokaryotes: the unseen majority. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 6578 – 6583.
 16. *Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N., Huntemann M., Richter M., Gloeckner F.O., Boffelli D., Anderson I.J., Barry K.W., Shapiro H.J., Szeto E., Kyrpides N.C., Musmann M., Amann R., Bergin C., Ruehland C., Rubin E.M., Dubilier N.* Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. // *Nature.* 2006. Vol. 443. P. 950 – 955.

Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ

Н.Л. Белькова^{1,2}

1 – Лимнологический институт СО РАН

2 – Иркутский государственный университет

1. Отбор биологического материала и первичная обработка проб

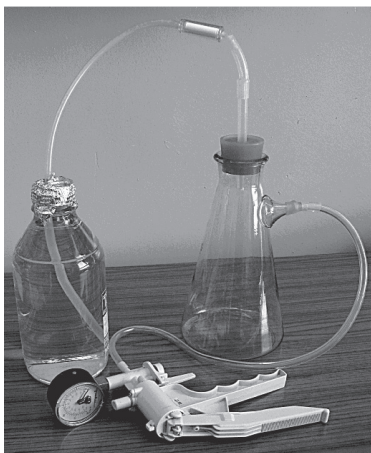
Пробы природной воды отбирали в стерильные стеклянные или пластмассовые флаконы, которые сначала ополаскивали три раза природной водой, а потом заполняли полностью, без пузырьков воздуха под крышкой флакона. Первичную обработку проводили в течение двух–трех часов после отбора. Бактериальный материал собирали фильтрованием на кассетные стерильные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (рис. 1).



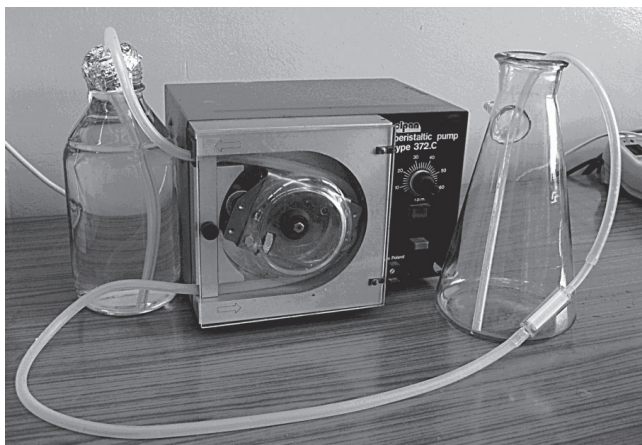
Рис. 1. Кассетные стерильные фильтры (Sterivex, Millipore), позволяющие стерильно концентрировать большой объем бактериального материала из водных проб.

В полевых условиях использовали ручной вакуумный насос, в лабораторных условиях фильтровали с помощью перистальтического насоса (рис. 2). После фильтрации в кассете оставляли не более 1/5 объема жидкости, и фильтр обрабатывали лизирующими растворами из коммерческих наборов (РИБО-сорб, ДНК-сорб Б, АмплиСенс, Москва) или фиксировали этанолом до конечной концентрации 70%. Фильтр хранили при

комнатной температуре или в холодильнике не более 7–14 дней до выделения ДНК.



А



Б

Рис. 2. Системы для фильтрации водных проб в полевых условиях с помощью ручного насоса (А) и в лабораторных условиях с помощью перистальтического насоса (Б).

Пробы бактериальных матов общим объемом не более 100 мкл отбирали стерильным пинцетом в пробирки на 1,5 мл, сразу же в полевых условиях фиксировали лизирующими растворами из коммерческих наборов

(РИБО-сорб, ДНК-сорб Б, АмплиСенс, Москва). Из каждого места отбора брали не менее трех повторностей для каждого типа предварительной обработки. В стерильные флаконы объемом 50 мл отбирали бактериальный мат с природной водой общим объемом 15 мл и фиксировали этанолом до конечной концентрации 70%. Пробы хранили при комнатной температуре или в холодильнике не более 7–14 дней до выделения ДНК.

Для выделения ДНК из осадков пробы отбирали в стерильные пластиковые пробирки, заполняя их на 2/3 объема грунтом, заливали сверху водой с места отбора, хранили при 4°C, без фиксации.

Подводные части тростника отбирали на мелководье (ихтиологический канал, Рыбинское водохранилище) в стерильные стеклянные пробирки. В лабораторных условиях в стерильные чашки Петри скальпелем делали соскобы со стеблей в стерильном трис-солевом буфере (ТСБ: 10 mM трис-HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 2 mM ЭДТА). Суспензию биологического материала объемом 100 мкл в трех повторностях использовали для выделения тотальной ДНК методом ферментативного лизиса. Дополнительно три аликвоты по 100 мкл перед выделением ДНК обрабатывали моноазидом этидиум бромидом (ЕМА) для удаления внеклеточной ДНК. Для этого к 100 мкл суспензии добавляли 2 мкл ЕМА (50 мг/мл), инкубировали во льду 1 мин при освещении 650 нм. Выдерживали в темноте 20 мин и использовали для выделения тотальной ДНК ферментативным лизисом.

2. Выделение ДНК

2.1. Метод ферментативного лизиса

Из кассетного фильтра удаляли этанол, заливали 1,8 мл ТСБ с лизоцимом (10 мкг/мл), лизис проводили в течение 60 мин при 37°C (Белькова, 2004). Затем добавляли 12 мкл протеиназы К (100 мг/мл), инкубировали 30 мин при 60°C.

Для более полного лизиса и денатурации белков добавляли 200 мкл 10% SDS и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Проводили 3 стадии замораживания-оттаивания, для этого фильтр замораживали в течение 30 мин при -20°C , а затем прогревали 20 мин при 60°C . Перед экстракцией белков и полисахаридов лизат шприцом выдавливали из кассеты, распределяя его в четыре пробирки по 500 мкл.

К лизату добавляли равный объем фенола, насыщенного трис-HCl (pH 8,0), эмульсию взбалтывали 15 мин и центрифугировали на настольной центрифуге 15 мин на максимальных оборотах (12000 об/мин). Водную фазу отбирали в новую пробирку и добавляли равный объем смеси фенол:хлороформ (1:1), взбалтывали 10 мин, центрифугировали 10 мин (12000 об/мин). Водную фазу аналогично обрабатывали еще раз равным объемом хлороформа. После экстракции макромолекул к водной фазе добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5,0) и 2 объема абсолютного этанола. ДНК осаждали в течение ночи при -20°C , собирали центрифугированием на настольной центрифуге на максимальных оборотах 30 мин (12000 об/мин).

Для удаления солей осадок промывали 400 мкл 70% холодного этанола, еще раз центрифугировали на настольной центрифуге на максимальных оборотах 20 мин (12000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, осадок подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера (ТЕ: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5; 1 мМ ЭДТА). ДНК хранили при температуре 4°C при проведении экспериментальной работы, а затем при -20°C .

Пробы бактериальных матов, фиксированные этанолом, отбирали в трех повторностях, объем каждой пробы не более 500 мкл. Клетки осаждали центрифугированием 30 мин (12000 об/мин), фиксатор удаляли, осадок суспендировали в 100 мкл трис-солевого буфера, а затем добавляли 300 мкл трис-солевого буфера с лизоцимом до конечной концентрации лизоцима в буфере 5 мг/мл. Лизис вели 60 мин при 37°C . Затем добавляли 25 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали 30 мин при 60°C . Всю дальнейшую

обработку проводили как описано выше.

Соскобы с тростника сразу же использовали для выделения ДНК. Поэтому к 100 мкл суспензии биологического материала без и после обработки ЕМА добавляли 300 мкл ТСБ с лизоцимом до конечной концентрации лизоцима в буфере 5 мг/мл. Лизис вели 60 мин при 37°C. Затем добавляли 25 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали 30 мин при 60°C. Всю дальнейшую обработку проводили как описано выше.

2.2. Метод очистки с применением ЦТАБ

Пробы бактериальных матов, фиксированные этанолом, отбирали в трех повторностях, объем каждой пробы не более 300 мкл. Клетки осаждали центрифугированием 30 мин (12000 об/мин), фиксатор удаляли. Для выделения ДНК к 50 мкл клеточной суспензии (в ТЕ буфере) добавляли 100 мкл лизирующего буфера с ЦТАБ (100 мМ трис-НCl, pH 8,0; 1,4 М NaCl; 2% ЦТАБ; 20 мМ ЭДТА) гомогенизировали 10 мин при 60°C (Грачев и др., 2006). Затем добавляли еще 150 мкл этого буфера и выдерживали 30 мин при 60°C, периодически перемешивая. Смесь центрифугировали 5 мин на настольной центрифуге (12000 об/мин), супернатант переносили в новую пробирку, а осадок промывали 100 мкл лизирующего буфера. Для этого осадок тщательно перемешивали на вортексе, прогревали 5 мин при 60°C и центрифугировали 5 мин на настольной центрифуге (12000 об/мин). Супернатанты объединяли и добавляли 5 мкл протеиназы К (10 мг/мл), смесь инкубировали 30 мин при 60°C. Затем добавляли 1 мл 1% водного ЦТАБ, перемешивали и осаждали цетавлоновую соль нуклеиновых кислот замораживанием при -20°C в течение ночи. Осадок собирали центрифугированием (15 мин, на настольной центрифуге, 12000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 300 мкл 1% водного цетавлона, перемешивали кратковременно на вортексе и центрифугировали 15 мин, на настольной центрифуге, 12000 об/мин. Обработку проводили два

раза. Супернатант удаляли, а осадок подсушивали на воздухе 20 мин. Проводили экстракцию нуклеиновых кислот этанолом. Для этого к осадку добавляли 400 мкл свежеперегнанного этанола, перемешивали, выдерживали 10 мин при 60°C, центрифугировали 30 мин на настольной центрифуге (12000 об/мин). Обработку проводили два раза. К объединенному супернатанту добавляли 80 мкл 3М ацетата натрия (pH 5,0) и выдерживали ночь при -20°C для осаждения нуклеиновых кислот.

Для удаления солей осадок промывали 400 мкл 70% холодного этанола, еще раз центрифугировали на настольной центрифуге на максимальных оборотах 20 мин (12000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, осадок подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл TE-буфера. ДНК хранили при температуре 4°C при проведении экспериментальной работы, а затем замораживали.

2.3. Выделение ДНК с помощью сорбентов

Для эффективной обработки проб бактериального материала в полевых условиях и возможности их хранения в температурном диапазоне от 4 до 20°C использовали коммерческие наборы российской фирмы АмплиСенс (Москва). Обработку лизирующими растворами проводили в полевых условиях, как было описано выше. В лабораторных условиях пробы прогревали 5–10 мин при 60°C, центрифугировали 15 мин на настольной центрифуге (12000 об/мин), надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. Кассетные фильтры обрабатывали аналогичным образом: прогревали, а затем шприцом выдавливали лизат в стерильные пробирки. К прозрачному лизату добавляли 25 мкл сорбента. Суспензию тщательно суспендировали на вортексе, выдерживали при комнатной температуре 5 мин, периодически перемешивая. Дальнейшую обработку вели, как рекомендовано в инструкциях фирмы-производителя.

Нуклеиновые кислоты элюировали в 25 мкл ТЕ буфера. Для этого осадок тщательно суспендировали, прогревали в термостате 5 мин при 60°C и центрифугировали 5 мин на настольной центрифуге на максимальных оборотах (12000 об/мин). Надосадочную жидкость тщательно, без сорбента отбирали в новую пробирку и использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

3. Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР использовали NТaq-полимеразу (НТИ-Байкал, Иркутск), которая не содержит загрязнения бактериальной ДНК. Праймеры использовали по 10 пикомоль каждого на 25 мкл реакционной смеси. Оптимальное количество матричной ДНК определяли титрованием в амплификации на консервативных бактериальных праймерах 500L и 1350R (таблица 1). Режим реакции:

94°C – 5 мин (1 цикл),

92°C – 45 сек, 50°C – 60 сек, 72°C – 90 сек (40 циклов),

72°C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации на групп-специфичных праймерах использовали следующие пары праймеров (таблица 1): 500L–1350R (EUB), 109L–915R (ARC), 333L–958R (ARC), 344L–915R (ARC), 106L–781R (CYA), 319L–1350R (BCT), 338L–930R (PLA), 235L–1350R (ACT), 35L–518R (ALF), 681L–1350R (ADF), 338L–663R (BET), 680L–1350R (BET), 342L–1350R (BLS), 380L–1350R (SRB). Набор пар праймеров был выбран для каждого бактериального сообщества индивидуально. Амплификацию на групп-специфичных праймерах проводили в следующем режиме реакции:

94°C – 5 мин (1 цикл),

92°C – 45 сек, 58 (64)°C – 45 сек, 72°C – 45 сек (35 циклов),

72°C – 5 мин (1 цикл).

Анализ клонов после проведения клонирования проводили на плазмидных праймерах, рекомендованных фирмой производителем и поставляемых в наборе для клонирования (GeneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas). В амплификацию брали 1 мкл лизата, полученного из биомассы бактерий из изолированных колоний на агаризованной среде. Режим реакции: 94°C – 5 мин (1 цикл),
92°C – 45 сек, 55°C – 45 сек, 72°C – 45 сек (30 циклов).

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе (Денисова и др., 1999; Lane, 1991; Manz et al., 1992, 1996; Neef et al., 1996; Overmann et al., 1999; Casamayor et al., 2000; Smits et al., 2004; Blackwood et al., 2005; Steven et al., 2007; Bottos et al., 2008).

Название праймеров	Последовательность 5'-3'	Филогенетическая группа
EUB338L	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Домен Eubacteria
EUB500L	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	
EUB518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	
EUB1350R	GACGGGCGGTGTGTACAAG	
ARC109L	ACKGCTCAGTAACACGT	Домен Archaea
ARC333L	TCCAGGCCCTACGGG	
ARC344L	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	
ARC915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	
ARC958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	
CYA106L	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	Линия Cyanobacteria
CYA781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	
CF319L	GTACTGAGACACGGACCA	Линия Bacteroidetes
ACT235L	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	Линия Actinobacteria
PLA930R	CTCCACCGCTTGTGTGA	Линия Planctomycetes
ADF681L	CTGGCTCAGAYCGAACG	Классы Alphaproteobacteria и Deltaproteobacteria
BET663R	GAATTCATCCCCCTCT	Класс Betaproteobacteria
BET680L	CRCGTGTAGCAGTGA	
BLS342L	CAGCAGTAGGGAATCTTC	Класс Bacillus
SRB380L	CCTGACGCAGCGACGCCG	Линия Nitrospira, класс Deltaproteobacteria, а также некоторые представители линий Gemmatimonadetes и Actinobacteria

После амплификации ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле в 0,5×ТА буфере (20 мМ трис-ацетат, pH 7,6). Полосы

нужной длины вырезали из геля и элюировали замораживанием-оттаиванием. Для этого полоски геля в пробирках эппендорф замораживали при -20°C , а затем центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Надосадочную жидкость собирали и использовали для лигирования или для подготовки ПЦР-продуктов к секвенированию.

4. Лигирование ПЦР-продукта и трансформация клеток *E.coli*

Для лигирования использовали набор GeneJETTM PCR Cloning Kit (Fermentas). ПЦР-продукты затупляли с помощью фермента ДНК-blinding. К реакционному буферу добавляли 2 мкл очищенного ПЦР-продукта и 1 мкл фермента DNA-blinding. Смесь тщательно перемешивали и инкубировали при температуре 70°C в течение 5 мин. Охлаждали во льду несколько секунд и сразу же ставили реакцию лигирования, добавляя 50 нг вектора pJET/blunt и 1 мкл Т4 ДНК-лигазы. Реакционную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

Компетентные клетки *E.coli* (штамм XL-1) для трансформации получали, используя методику трансформации CaCl_2 -зависимых клеток (Sambrook et al., 1989). Для трансформации в каждую пробирку с компетентными клетками добавляли по 3 мкл лигазной смеси, тщательно перемешивали, выдерживали 30 мин и проводили «тепловой шок». Для «оживления» клеток добавляли 800 мкл среды SOC, суспензию инкубировали 45 мин при 37°C . Для скрининга колоний клетки высевали на чашки Петри с твердой средой LB, содержащей 20 мкг/мл ампициллина. Анализировали все выросшие колонии. Для быстрого скрининга большого числа колоний использовали метод «кипячения» клеток. Для этого биомассу клеток отобранных колоний переносили в пробирки эппендорф, содержащие 20 мкл безбактериальной воды, суспензию клеток кипятили 5 мин, а затем замораживали. Такой лизат клеток после центрифугирования (15 мин, 12000 об/мин) использовали в качестве матрицы в ПЦР на плазмидных праймерах.

5. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей

Анализ полученных последовательностей проводили путем их сравнения с последовательностями, зарегистрированными в международной базе данных с помощью пакета программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>). Наличие химерных структур определяли анализом последовательностей с имеющейся базой данных с помощью пакета программ CHECK CHIMERA (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>).

Список литературы

1. Белькова Н.Л. Таксономическое разнообразие микробного сообщества водной толщи озера Байкал. // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владивосток: ДВГУ, 2004. 20 с.
2. Грачев М.А., Кузнецова С.Ю., Щербакова Т.А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции. // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 180–183.
3. Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулохонов И.И., Зайчиков Е.Ф. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК. // Микробиология. 1999. Т. 68. №4. С. 475–483.
4. Blackwood C.B., Oaks A., Buyer J.S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71, No. 10. P. 6193–6198.
5. Bottos E.M., Vincent W.F., Greer C.W., Whyte L.G. Prokaryotic diversity of arctic ice shelf microbial mats // Environmental Microbiology. 2008. Vol. 10. No. 4. P. 950–966.
6. Casamayor E.O., Schaefer H., Baneras L., Pedros-Alio C., Muyzer G. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by

- Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. No. 2. P. 499–508.
7. *Lane D.* 16s/23s rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom, 1991. P. 115–175.
 8. *Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.-H.* Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions // *Syst. Appl. Microbiol.* 1992. Vol. 15. P. 593–600.
 9. *Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K.-H.* Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment // *Microbiology*. 1996. Vol. 142, No. 5. P. 1097–1106.
 10. *Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.-H.* Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes // *Microbiology*. 1998. Vol. 144. P. 3257–3266.
 11. *Overmann J., Coolen M.J.L., Tuschak C.* Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments // *Arch. Microbiol.* 1999. Vol. 172. P. 83–94.
 12. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning. A laboratory Manual* // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 1, 2, 3.
 13. *Smits T.H.M., Devenoges C., Szynalski K., Maillard J., Holliger C.* Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities // *J. Microbiol. Methods*. 2004. Vol. 57. P. 369–378.
 14. *Steven B., Briggs G., McKay C.P., Pollard W.H., Greer C.W., Whyte L.G.* Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods // *FEMS Microbiol Ecol.* 2007. Vol. 59. P. 513–523.

Определение генетического разнообразия в накопительных культурах микроорганизмов

Э.В. Данилова¹, Н.Л. Белькова^{2,3}

1 – *Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН*

2 – *Лимнологический институт СО РАН*

3 – *Иркутский государственный университет*

Термальные источники или гидротермы широко распространены в природе и достаточно хорошо изучены с позиции геологии и химии (Борисенко, Замана, 1978; Крайнов, Швец, 1980; Перельман, 1982; Посохов, 1975). Все они относятся к областям активного современного и молодого четвертичного вулканизма, что свидетельствует о тесной связи магматизма и гидротерм. Геотермальные месторождения и проявления вулканизма связаны, обычно, с крупными тектоническими зонами, такими, как геосистемы Камчатки, рифтовые зоны Восточной Африки и Исландии, Долина Больших Гейзеров в США и др. По гидрогеохимическим признакам выделяют три группы вод: азотные, азотно-углекислые и сернисто-углекислые (Посохов, 1975; Перельман, 1982; Плюснин и др., 2000). Температурные же параметры позволяют гидрогеохимикам разделить гидротермы на высокопотенциальные – с температурой теплоносителя выше 100°C (пароводяные смеси, пар) и средне- и низкопотенциальные с температурой до 100°C. В последнее время гидротермы интенсивно изучаются биологами, и, в первую очередь, микробиологами, как уникальные экосистемы, потому что микробные сообщества гидротерм относят к наиболее древним биоценозам и предполагают, что они прошли неизменными через всю историю Земли (Заварзин, 1984; Горленко и др., 1985; Заварзин, 2002). Древняя атмосфера, образованная в результате дегазации Земли, была близка по своему составу к современным вулканическим эксгаляциям, которые в значительной степени развиты в горных системах. Предполагается, что микроорганизмы могут ускорять

процесс минералообразования. Исследуя горячие источники Mammoth Hot Springs, расположенные на территории американского национального парка Йеллоустоун, ученые обнаружили, что теплолюбивые бактерии – термофилы – могут катализировать процесс образования слоистых кремнистых структур, который долгое время считался химическим (Chafetz, Guidry, 2003; Fouke et al., 2003; Lowe, Braunstein, 2003).

В настоящее время показано, что в районах современного вулканизма микроорганизмы принимают активное участие в превращениях соединений серы, железа и многих других элементов, перерабатывают газовую составляющую вулканических эксгаляций и, таким образом, выполняют огромную геохимическую работу (Плюснин и др., 2000; Татарinov и др., 2006; Татарinov и др., 2007).

Многочисленные выходы холодных и термальных минеральных вод в горной системе Восточного Саяна располагаются по линиям тектонических разломов. Формирование химического состава воды и образование травертинов в гидротерме Хойто-Гол связаны с активной деятельностью микроорганизмов и геолого-геодинамической обстановкой. Трансформация подземных вод на поверхности земли осуществляется при участии прокариот и водорослей, формирующих толстые многослойные маты в районе излива и теплом ручье. Значения pH и Eh по течению ручья возрастают, соответственно, от 7,5 до 9,1 и от +4 до +194 мВ. Концентрация свободной углекислоты и сероводорода в газовой фазе снижается от 45,4–57,2 мг/л и 23,8–25,8 мг/л до нуля в зоне травертинообразования (Данилова и др., 2005; Данилова и др., 2009).

В трансформации химического состава вод участвуют цианобактерии и фотобактерии, аэробные и анаэробные органотрофы, сульфатредукторы и сероокисляющие бактерии, метаногены. Функциональное разнообразие микробных сообществ возрастает по мере удаления от грифона. В районе выходов воды формируются серные маты в форме “косм”, представленные бесцветными серобактериями вида *Thiothrix* sp. (рис. 1).

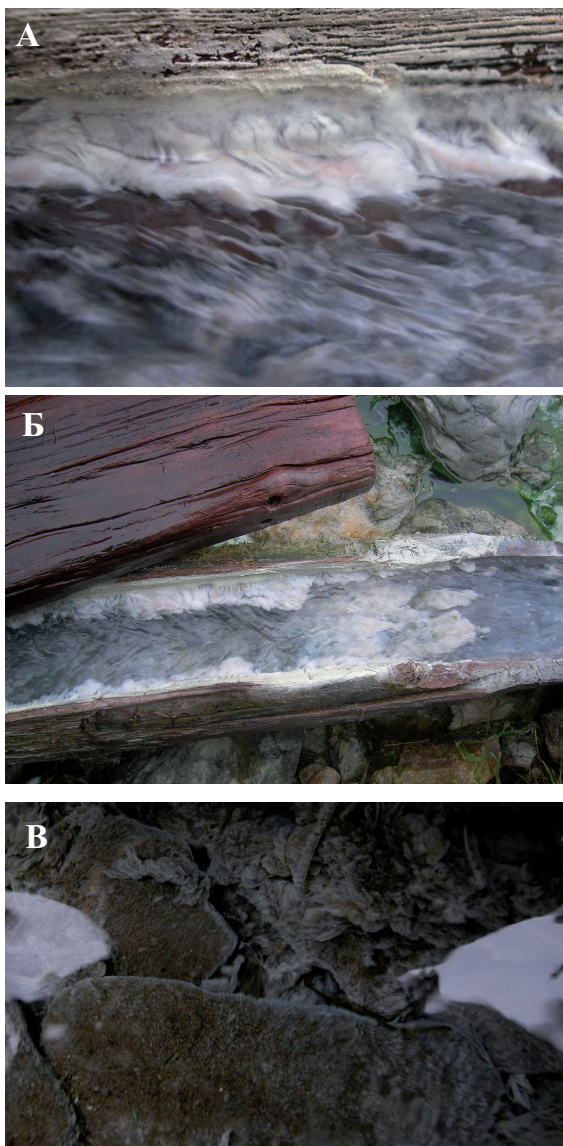


Рис. 1. Белые серные маты, формирующиеся в местах выхода термальных вод в виде «косм» (А), в неосвещенных участках по изливу (Б) и по краям ручьев (В).

На освещенных участках, наряду с серобактериями, в состав бактериального сообщества входят цианобактерии *Oscillatoria tenuis* и *Phormidium gelatinosum*. Далее по ручью наблюдается широкое развитие

многокомпонентных микробных матов, состоящих из бесцветных серобактерий, пурпурных фотобактерий и цианобактерий (рис. 2).



Рис. 2. Многокомпонентные маты, формирующиеся по излиям ручьев.

В циано-бактериальных матах наблюдается вертикальная зональность. Первый слой – активного окислительного фотосинтеза с преобладанием цианобактерий родов *Oscillatoria*, *Phormidium*. Второй – зона анаэробного фотосинтеза с пурпурными бактериями, представленными видами, близкими к *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, *Thiocapsa* sp., *Chlorobium* sp. Третий – зона анаэробной деструкции с бактериями сульфидогенами и метаногенами. Сульфатредуцирующие бактерии отнесены к роду *Desulfovibrio*. По краям ручьев распространены однослойные белые маты, которые состоят из бесцветных серобактерий родов *Thiothrix* и *Beggiatoa*. Основным компонентом редко встречающихся однослойных матов оранжевой окраски являются цианобактерии *Oscillatoria* sp. С ними ассоциируют скопления диатомовых водорослей *Diatomea* sp.

В щелочных (pH 8,8–9,1) и окислительных условиях (Eh от +154 до +194 мВ) происходит интенсивный процесс литификации микробных матов с

образованием травертинов, который подавляет продукцию органического вещества и формирование толстых бактериальных матов. Тонкие и рыхлые маты цементируются карбонатами, преобразуясь в сплошные травертиновые корки. Эти корки надстраиваются над более древними травертиновыми структурами и образуют многометровые купола в районе выходов термальных вод (Плюснин и др., 2000; Татаринов и др., 2006).

В исследуемых источниках Хойто-Гол присутствует два типа матов, геохимическая функция которых различна (Данилова и др., 2009). Цианобактериальный мат является продуцентом кислорода и органического вещества. Серный мат активно участвует в круговороте серы в источниках, основная деятельность которого сводится к окислению сероводорода. Необходимо отметить, что сероводород в исследуемых источниках содержится в значительном количестве – 23,8 мг/л. Наряду с продуцентами в круговороте углерода и серы большую роль играют бактерии-деструкторы, которые находятся в данной экосистеме в значительном количестве.

Другим не менее интересным объектом являются накопительные культуры железобактерий. Таксономическое разнообразие микроорганизмов, окисляющих железо в аэробных условиях при нейтральных значениях pH среды, представляет большой интерес исследователей. Наряду с «классическими» видами «железобактерий» из родов *Leptothrix*, *Galionella* и *Siderocapsa*, способностью к окислению железа обладают и некоторые представители гетеротрофных микроорганизмов. Трудности изучения этих микроорганизмов связаны с тем, что они стабильно культивируются в лабораторных условиях в виде накопительных культур, получить изолированную культуру для некоторых штаммов не удастся. В лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН из проб донных осадков, отобранных в разных районах оз. Байкал, на селективной среде были получены активные накопительные культуры железоокисляющих бактерий (Granina et al., 2003). Они были использованы для анализа генетического разнообразия.

Цель настоящего исследования – показать возможности разных методов молекулярно-генетического анализа накопительных культур.

Материалы и методы

Пробы ила и микробных матов отбирали в стерильные флаконы. Накопительные культуры протеолитических и целлюлозоразлагающих бактерий определяли на селективной среде Пфеннига (на 1 л воды: KH_2PO_4 – 0,3 г; NH_4Cl – 0,3 г; MgCl_2 – 0,3 г; CaCl_2 – 0,3 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г, pH 7,0) с субстратом 1,5% содержанием пептона и полосок фильтровальной бумаги, соответственно (рис. 3).



Рис. 3. Накопительные культуры целлюлозоразлагающих бактерий.

Для выделения суммарной ДНК были отобраны следующие пробы:

1. Нг 08-1 – природный серный мат (2 повторности);
2. Нг 08-2 – накопительная культура протеолитиков (2 повторности);
3. Нг 08-3 – 4-недельная накопительная культура целлюлозоразлагающих бактерий (2 повторности);

4. Нг 08-4 – 2-недельная накопительная культура целлюлозоразлагающих бактерий (2 повторности).

Пробу серного мата объемом 0,5 мл отбирали стерильным скальпелем и пинцетом, промывали 100 мл ТСБ, гомогенизировали и делили материал на две порции, одну из которых обрабатывали ЕМА, как было описано в методической главе сборника. Суспензии накопительных культур протеолитиков и целлюлозолитиков по 100 мкл центрифугировали 20 мин (12000 об/мин), суспендировали в 100 мкл ТСБ, делили на 2 пробирки, одну из которых также обрабатывали ЕМА. Дальнейшую обработку бактериального материала и молекулярно-генетический анализ проводили, как было описано в методической статье сборника (стр.53).

Результаты и обсуждение

Накопительные культуры представляют собой небольшое разнообразие нескольких видов микроорганизмов, выполняющих в селективных условиях одинаковую функцию, участвующих в последовательной деградации комплексных макромолекул или продуцирующих метаболиты, которые необходимы для роста и развития организмов-компаньонов. Молекулярно-генетические методы исследования генетического разнообразия должны быть аналогичны тем, которые применяются для любых смешанных микробных сообществ. Они предполагают получение ПЦР-продуктов для секвенирования либо после процедуры амплификации и клонирования, либо амплификации и разделения продуктов с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза.

Накопительные культуры протеолитиков и целлюлозоразрушающих микроорганизмов были проанализированы амплификацией протяженного фрагмента гена 16S рРНК длиной около 900 пар оснований (п.о.), а для накопительных культур железо-бактерий был получен ПЦР-продукт длиной около 500 п.о. Результаты денатурирующего градиентного гель-

электрофореза показали, что только одна (№8) из 10 проанализированных культур является чистой культурой и содержит одну полосу (рис. 4).

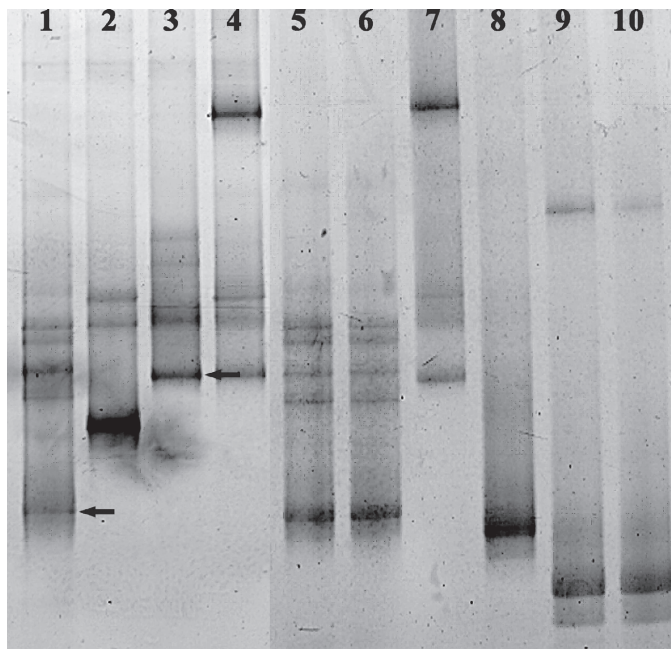


Рис. 4. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез ПЦР-продуктов, полученных из накопительных культур железобактерий. Стрелками обозначены доминирующие полосы.

Накопительные культуры №1, №5 и №6 имеют одинаковый набор полос, и, следовательно, их можно считать одинаковыми по составу микрофлоры. Аналогичный результат получен для накопительных культур №4–№7 и №9–№10. Из литературных данных известно, что количество полос, полученных в результате разделения ПЦР-продуктов в градиентном гель-электрофорезе, не всегда соответствует количеству штаммов, различающихся по результатам дальнейшего секвенирования (Muzyer et al., 1993; Wawer et al., 1995). Однако, следует отметить, что для всех проанализированных нами ПЦР-продуктов (за исключением №8) получено от 3 до 6 различных полос, что соответствует наличию в составе

накопительной культуры более, чем двух различных штаммов. Хотя характер полученных паттернов не всегда одинаков, практически для всех культур можно отметить наличие двух доминирующих полос и от 2 до 4 минорных полос, что позволяет предположить наличие дополнительных сопутствующих бактерий, развивающихся в этих селективных условиях.

После проведения клонирования и частичного секвенирования полноразмерных вставок из клонов получено невысокое разнообразие генотипов в накопительных культурах протеолитиков (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ полученных последовательностей с имеющимися в EMBL-базе данных.

Номер посл.-ти (количество клонов)	Длина (п.о.)	Ближайший гомолог (процент гомологии)	Филогенетическая группа
Накопительная культура протеолитиков			
UU-1 (4)	876	AY949860 <i>Bacteroides</i> sp. (98.9%)	Bacteroidetes/ Chlorobi
UU-2 (5)	898	AB276316 <i>Clostridium</i> sp. (97.4%)	Firmicutes
UU-3	857	DQ019167 <i>Exiguobacterium</i> sp. (93.4%)	Firmicutes
UU-4	856	AJ430343 <i>Comamonas</i> sp. (98.7%)	Бета- протеобактерии
Накопительная культура протеолитиков (обработка с ЕМА)			
UU-23 (2)	837	AJ319867 <i>Bacteroides</i> sp. 89.2	Bacteroidetes/ Chlorobi
UU-20 (3)	889	AJ430343 <i>Comamonas</i> sp. (98.9%)	Бета- протеобактерии
UU-21	876	AJ237966 <i>Delftia</i> sp. 94.7	Бета- протеобактерии
UU-25	756	AJ295350 некультивируемая бактерия (95.0%)	Не определена авторами

Обработка ЕМА позволила выявить дополнительные генотипы, которые, по-видимому, присутствуют в культуре в незначительном количестве. Более того, в обоих случаях определены как доминирующие генотипы, так и минорные.

Следует отметить дополнительное преимущество, которое дает проведение генетического анализа посредством амплификации и клонирования: получен спектр нуклеотидных последовательностей, длина которых варьирует от 756 до 898 п.о. и которые могут быть использованы не только для идентификации, но и для выяснения филогенетических взаимоотношений в пределах определенных филогенетических линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта МО РФ РНП 2.1.1./2165, НОЦ «Байкал».

Список литературы

1. *Борисенко И.М., Замана Л.В.* Минеральные воды Бурятской АССР. Улан-Удэ: Бурятское книж. изд-во, 1978. – 162 с.
2. *Горленко В.М., Компанцева Е.И., Пучкова Н.Н.* Влияние температуры на распространение фототрофных бактерий в термальных источниках. // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 5. С. 848 – 853.
3. *Данилова Э.В., Дамбаев В.Б., Намсараев Б.Б.* Биоразнообразие микроорганизмов, участвующих в процессах минералообразования. // Вестник БГУ. Серия 2. Биология. 2005. Вып. 7. С. 134 – 138.
4. *Данилова Э.В., Бархутова Д.Д., Брянская А.В., Намсараев З.Б., Намсараев Б.Б.* Влияние экологических условий на распределение функциональных групп микроорганизмов в минеральных источниках Хойто-Гол (Восточные Саяны). // Сибирский экологический журнал. 2009. № 1. С. 45 – 53.
5. *Заварзин Г.А.* Бактерии и состав атмосферы. М.: Наука, 1984. – 199 с.
6. *Заварзин Г.А.* Микробный геохимический цикл кальция. // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 5 – 22.
7. *Крайнов С.Р., Швец В.М.* Основы геохимии подземных вод. М.: Недра, 1980. – 285 с.
8. *Перельман А.И.* Геохимия природных вод. М.: Наука, 1982. – 200 с.

9. *Плюснин А.М., Суздальницкий А.П., Адушинов А.А., Миронов А.Г.* Особенности формирования травертинов из углекислых и азотных термальных вод в зоне Байкальского рифта. // Геология и геофизика. 2000. Т. 41. №4. С. 564 – 570.
10. *Посохов Е.В.* Общая гидрогеохимия. Л.: Недра, 1975. – 208 с.
11. *Татаринов А.В., Яловик Л.И., Данилова Э.В., Намсараев З.Б.* Участие микроорганизмов в образовании травертинов и сапропелитового керогена в отложениях термальных углекислых вод Байкальской рифтовой зоны. // Доклады Академии Наук. 2006. Т. 411. №4. С. 514 – 518.
12. *Татаринов А.В., Яловик Л.И., Данилова Э.В., Прокопчук С.И., Жмодик С.М., Бархутова Д.Д.* Роль микроорганизмов в гипергенном преобразовании полиметаллических руд и формировании биогеохимических аномалий благородных металлов на месторождениях Забайкалья. // Доклады Академии Наук. 2007. Т. 414. №5. С. 1 – 5.
13. *Chafetz H.S., Guidry S.A.* Deposition and diagenesis of Mammoth hot springs travertine, Yellowstone National Park, Wyoming, USA // Can. J. Earth Sci. 2003. Vol. 40. P. 1515 – 1529.
14. *Fouke B.W., Bonheyo G.T., Sanzenbacher B., Frias-Lopez J.* Partitioning of bacterial communities between travertine depositional facies at Mammoth hot springs, Yellowstone National Park, USA // Can. J. Earth Sci. 2003. Vol. 40. P. 1531 – 1548.
15. *Granina L.Z., Parfenova V.V., Zemskaya T.I., Zakharova Yu.R., Golobokova L.P.* On Iron and Manganese Oxidizing Microorganisms in Sedimentary Redox Cycling in Lake Baikal // Berliner Palaobiologische Abhandlungen. ; 2003. V. 4. P. 121 – 128.
16. *Lowe D.R., Braunstein D.* Microstructure of high-temperature (>73°C) siliceous sinter deposited around hot springs and geysers, Yellowstone National Park: the role of biological and abiological processes in sedimentation // Can. J. Earth Sci. 2003. Vol. 40. P. 1611 – 1642.

Определение условий пробоотбора для получения корректных молекулярно-генетических данных

О.П. Дагурова¹, Е.В. Суханова², И.В. Рыбакова³, Е.В. Дзюба²,

Н.Л. Белькова^{2,4}

1 – *Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН*

2 – *Лимнологический институт СО РАН*

3 – *Институт биологии внутренних вод РАН*

4 – *Иркутский государственный университет*

Современные методы молекулярно-генетического анализа, включающие секвенирование рибосомных генов посредством выделения ДНК и амплификации, за последние 20 лет стали мощным инструментом в микробной экологии. В настоящее время изучение любого микробного сообщества начинается с установления его генетического разнообразия. При этом, необходимо соответствующим образом не только адаптировать весь комплекс молекулярных методов, но и определить ключевые правила сохранения или фиксации бактериального материала из природной пробы. Влияние одного из таких параметров – температуры – было подробно изучено для проб донных осадков еще на заре этих исследований (Rochelle et al., 1992). Показано, что хранение проб при разных температурных режимах приводит к определению различных спектров генотипов, причем различаются даже представители доминирующих групп.

При отборе водных проб основная задача заключается в концентрировании бактериального материала из больших объемов воды, поэтому вопрос о достоверной выборке и равномерной представленности отдельных компонентов микробного сообщества не является первостепенным. Однако, при изучении бактериальных сообществ почв или донных осадков, а также микробных ассоциаций с другими организмами, принципиальным становится определение условий и проведение отбора проб, чтобы получить достоверное представление о полном спектре генотипов микроорганизмов.

Цель настоящего исследования – на примере трех разных микробных сообществ: донных осадков озера Байкал и микробных ассоциаций кишечной микрофлоры лососевидных рыб и обрастаний макрофитов Волжского плеса Рыбинского водохранилища, получить данные о достоверной выборке и равномерной представленности филогенетических групп микроорганизмов.

Материалы и методы

Краткая характеристика объектов исследования

(1) Донные осадки озера Байкал

Байкал – одно из величайших и самое глубокое озеро мира с уникальным биорежимом. Функционирование сообществ организмов Байкала обеспечивает в комплексе с другими природными особенностями водоема высокие качество и чистоту вод озера. Одним из существенных компонентов биоты водоема являются микроорганизмы, играющие важную роль в круговороте веществ и энергии. Донные осадки Байкала – благоприятная для развития бактерий экосистема, где они участвуют в процессах раннего диагенеза осадочного материала. Наибольшая активность микроорганизмов наблюдается в местах поступления и концентрации органического вещества – в поверхностных слоях осадков и прибрежных районах, особенно приустьевых участков рек (Намсараев, Земская, 2000). Их роль возрастает в анаэробных зонах водоемов. При изучении осадков важно учитывать их микрозональность, близлежащие участки осадка могут значительно отличаться по своим микробиологическим характеристикам, что связано с неравномерностью поступления и последующего перераспределения органического вещества в осадки. Прибрежная зона представляет собой экотонную (пограничную) зону, где, как правило, располагаются геохимические барьеры, и происходит быстрая трансформация веществ. В амфибиальных ландшафтах процессы в донных отложениях приобретают решающее значение (Заварзин, 2003).

Мелководные заливы (соры) озера можно отнести к экотонной (переходной) зоне между озером и побережьем. Мелководье этих заливов отличается хорошей прогреваемостью в летний период и высокой продуктивностью (Кулагин, Помазкина, 1977). Формирование химического состава вод заливов зависит от многих факторов, главным из которых является речной сток. С водами притоков в заливы Байкала поступают значительное количество взвесей, органического и неорганического вещества. Высокие значения продукции и деструкции в воде указывают на интенсивную скорость круговорота углерода и активную роль микроорганизмов в функционировании экосистемы (Намсараев и др., 2008). Воды открытых частей заливов по химическому составу близки к байкальским, несколько обогащены органическим веществом и характеризуются повышением содержания компонентов ионного состава благодаря подтоку речных вод (Мещерякова, Верболова, 1977). Иловые воды поверхностных слоев осадков по своему химическому составу близки байкальской воде. Содержание ионов и биогенных элементов в грунтовых водах повышено по сравнению с их содержанием в придонных и, тем более, поверхностных водах (Атлас Байкала, 1993).

Своеобразие экологических условий по сравнению с участками открытого Байкала может предполагать особенности структуры и функционирования микробного звена. В мелководных заливах распространение и активность микроорганизмов изучено слабо.

Залив Провал расположен в районе дельты главного притока Байкала – реки Селенга, он образовался при землетрясении 1862 г. при опущении блока земной коры. Площадь залива составляет около 200 кв. км, максимальная глубина 4 м, средняя глубина – 2 м. В воде залива присутствует большое количество взвешенных веществ, преимущественно минерального происхождения. По развитию фитопланктона залив отличается от других соров, так как находится под влиянием реки и характеризуется богатством видового состава водорослей (Кулагин, Помазкина, 1977). Грунты в заливе

представлены песками (береговая полоса), алевроитовыми и крупноалевритовыми илами (Атлас Байкала, 1993). Величины продукции и деструкции в воде и осадках сопоставимы с таковыми в других сорах. При анаэробной деструкции на конечных этапах возрастает роль бактериальной редукции сульфатов, в отличие от глубоководных осадков Байкала. Численность бактерий в воде летом достигает 2,1 млн. кл./мл, в осадках – 1,4 млрд. кл./мл. Обнаружены первичные бактерии-деструкторы, разлагающие белки и целлюлозу (Гаранкина и др., 2009).

Микробные сообщества почв и донных осадков – экосистемы, наиболее активно изучаемые с помощью молекулярных методов. Именно они стали объектами, для которых первыми были описаны основные правила и требования, которые необходимо выполнять для получения корректных молекулярных данных (Rochelle et al., 1992).

Для выделения ДНК из осадков залива Провал была взята проба заиленного песка, отобранная в 30 м от береговой полосы (глубина водной толщи 50 см), в июле 2008 г. Содержание органического углерода – 1,8% сухого вещества. В лабораторных условиях отобраны четыре отличающиеся по структуре и внешнему виду фракции около 100 мкл каждая следующего типа:

- песок из верхнего слоя пробы;
- верхний слой, песок с коричневым наилком;
- вода с наилком;
- песок из глубинного слоя пробы.

Выделение ДНК проводили коммерческим набором ДНК-сорб-В по модифицированной методике, а все дальнейшие этапы анализа, как описано выше в методической статье сборника (стр.53).

(2) Кишечная микрофлора лососевидных рыб

Кишечная микрофлора рыб традиционно изучается классическими микробиологическими методами культивирования для скрининга штаммов,

имеющих перспективные физиолого-биохимические свойства. Существенное ограничение этого подхода заключается в невозможности получения данных о некультивируемых микроорганизмах. В последнее время появились сравнительные исследования, включающие комплекс молекулярно-генетических методов. Первоначально эти методы широко использовали для уточнения видовой принадлежности культивируемых штаммов и для подбора подхода быстрой и эффективной видо-специфичной диагностики бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний рыб (Haygood et al., 1992; Haygood, 1993; Van der Maarel et al., 1999; Spanggaard et al., 2000; Buller, 2004 и др.), а сейчас адаптируют для изучения структурно-функционального разнообразия микрофлоры. Специфика исследования кишечной микрофлоры заключается во взятии биологического материала организма-хозяина и невозможности полного разделения собственно объекта исследования – ДНК микроорганизмов от ДНК организма-хозяина, по крайней мере, до стадии полимеразной цепной реакции. Совершенно очевидно возникает вопрос о корректном проведении пробоотбора, чтобы получить наиболее полное представление о микробном разнообразии.

В работе использованы три экземпляра черного байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874, отобранные в высокогорном озере Восточных Саян в июле 2009 г. Рыб отлавливали жаберными сетями (ячея 14–20 мм), на глубинах 0,5–3,0 м. Первичная и камеральная обработка материала по биологии рыб проводилась по общепринятым в ихтиологии методикам (Чугунова, 1959; Руководство ..., 1961; Правдин, 1966).

При вскрытии рыб необходимо соблюдать ряд основных правил, чтобы добиться успеха в поставленной задаче. Только что умерщвленных рыб необходимо препарировать немедленно. Мертвые рыбы при комнатной температуре разлагаются очень быстро. Уже через несколько минут ткани и органы изменяются. Перед тем, как умертвить рыбу, необходимо иметь под рукой уже подготовленные для этого инструменты. Инструменты должны быть промыты водой или физиологическим раствором. Умерщвление рыбы

проводится с целью последующего вскрытия. Для умерщвления рыбы с помощью острых ножниц перерезают позвоночный столб на затылке. Смерть наступает моментально, однако могут наблюдаться рефлекторные мускульные сокращения. Сразу после умерщвления начинают препарирование.

Вскрытие осуществляется с помощью либо скальпеля, либо острых ножниц. Инструменты (скальпель, ножницы, пинцеты и т.д.) непосредственно перед взятием материала дополнительно смачивают денатурированным спиртом и обжигают на пламени. Рыбу кладут на правый бок брюшной стороной к вскрывающему и фиксируют на доске в области головы и хвоста. Туловище рыбы с левой стороны освобождают от слизи и чешуи, удаляют грудной и брюшной плавники, бок и брюшко протирают ватным тампоном, смоченным спиртом. Осторожно, чтобы не повредить кишечник, прокалывают концом одной из бранш ножниц брюшную стенку выше ануса. Вскрытие начинают с дугообразного разреза вперед и вверх к позвоночному столбу и далее вперед к жаберной крышке за основание грудного плавника. Пинцетом захватывают брюшную стенку и удаляют, разрезая по средней линии, идущей от анального отверстия до грудных плавников. Если при вскрытии внутренние органы не повреждены, то кровь не выступает, или же она появляется в очень незначительном количестве.

Желудочно-кишечного тракт перерезают у глотки и анального отверстия стерильными инструментами, затем в чистой кювете расправляют и производят разделение на отделы. Кишечник рыб разделяется на три отдела: передний, средний и задний. Границей между передним и средним отделами обычно считают место впадения в кишку протока желчного пузыря. У костистых рыб в месте границы между средним и задним отделами находится клапан или отмечается общее сужением кишки, или слизистая оболочка кишки имеет характерное строение поверхности.

Для выделения суммарной ДНК взяты фрагменты кишечника: передний, средний и задний, которые были предварительно вскрыты. Выделение

тотальной ДНК проводили методом ферментативного лизиса и с цетавлоном. Дальнейшую обработку материала вели, как описано выше в методической статье сборника (стр.53).

(3) Микробные ассоциации с макрофитами

При оценке роли бактериального сообщества в жизни водоема, как правило, рассматриваются структурно-функциональные показатели планктонной его части. Между тем роль бактериального сообщества ассоциированного с макрофитами в продукционно-деструкционных процессах прибрежной зоны водоемов остается мало изученной. Перифитон – один из основных компонентов биоценозов на мелководьях водохранилищ. В водной среде большая часть микроорганизмов находится на твердых поверхностях: частицах взвешенного детрита, камнях, искусственных сооружениях (Горбенко, 1977; Инкина, 1987). Водные растения в данном случае являются идеальным субстратом для эпифитных микроорганизмов, большинство которых является потенциальными деструкторами и после отмирания растений участвуют в разложении органического вещества самого растения. Прижизненное выделение макрофитами большого количества легкоокисляемых органических веществ (Коврижных, 1989; Якубовский, 1977), а также высвобождение его по мере отмирания и распада водных растений создают условия для обильного развития сапрофитной микрофлоры, обуславливая присутствие больших количеств бактерий, способных разлагать клетчатку и продукты ее разрушения. У большинства исследователей не вызывает сомнения вывод о преобладании микробиологической природы процессов разложения растительных тканей. При наличии макрофитов в прибрежной зоне водоема количество микроорганизмов на 1м² многократно возрастает за счет перифитона растений. И если в воде профундали представители многих физиологотрофических групп бактерий встречаются в незначительном количестве, присутствуя в основном в придонном слое, в термоклизе или в

поверхностной пленке воды, то в литоральной зоне и в частности в перифитоне, обнаруживается широкий спектр бактерий различной физиологотрофической направленности.

Рыбинское водохранилище по общим запасам растительности занимает первое место среди Волжских водохранилищ. Со времени первого геоботанического обследования в 1956 г. (Белавская, Кутова, 1966) годовая продукция гидрофильной растительности водохранилища увеличилась в 2,7 раза. За этот же промежуток времени существенно возросли площади зарослей. Общая площадь прибрежной зоны Рыбинского водохранилища в настоящее время составляет 915 км² – это пятая часть площади всего водоема. Литораль Волжского плеса представляет особый интерес. Около 15 тыс. гектаров мелководий заняты зарослями макрофитов и 17% из них приходится на Волжский плес. Общая годовая продукция высшей водной растительности в органическом веществе составляет около 80 тыс. тонн, 12 тыс. тонн из которых продуцируется в Волжском плесе (Ляшенко, 1995).

Прибрежная зона водохранилища и непосредственно заросли макрофитов характеризуются значительными гидрохимическими различиями. В летний период температура воды в зарослях высших водных растений меняется в пределах 20–27°C, достигая в зарослях нитчатки 31°C. Результаты исследований показывают, что высокое содержание биогенных элементов и органических веществ характерно как для мест подверженных антропогенному воздействию (Копылов и др., 2000), так и для зарослей макрофитов. Концентрация растворенного кислорода в воде прибрежной зоны соответствует практически полному насыщению. В болотной, цветной воде непроточных зарослей макрофитов регистрировали низкое содержание кислорода (2,8 мг О₂/л. Вода в зарослях макрофитов характеризуется также максимальным содержанием минерального – 0,328 мг Р/л и общего – 0,421 мг Р/л фосфора, при средних величинах 0,109 и 0,177 мг Р/л, соответственно. Количество органического вещества среди водных растений также

максимально, достигает 42 мг/л при колебании по прибрежным станциям от 15 мг/л (Рыбакова, Васильева, 2003).

Численность и биомасса бактериоперифитона ассоциированного с макрофитами составляют десятки миллионов клеток и доли миллиграмма их массы на грамм растения. Формирование биомассы бактериоперифитона существенно зависит от количества крупных бактериальных клеток, палочек и нитей, вклад которых в формирование общей биомассы к осени увеличивается с 31 до 68% (Рыбакова, 2006). Абсолютные значения численности и биомассы бактерий в обрастаниях конкретных видов растений имеют большой разброс и в значительной степени зависят от фазы развития и состояния растений. Наиболее высокое количество и разнообразие бактерий перифитона характерно для августа, в период максимального развития макрофитов, совпадающего с началом прижизненного разложения отдельных частей растений. Для изучения филогенетического разнообразия бактериоперифитона целесообразно производить отбор материала именно в этот период.

Микробные ассоциации с макрофитами – наиболее слабо изученные сообщества с применением молекулярных методов. Имеющиеся сведения касаются в основном физиологотрофических групп, обладающих метаболическими особенностями (Кудрявцев, 1983; Якушин, 1997). Работы зарубежных авторов посвящены анализу разнообразия прибрежного бактериопланктона и бактерий, ассоциированных с некоторыми макрофитами (Acinas et al., 2004). Однако в обрастаниях макрофитов обнаружены разнообразные прокариотические организмы: бактерии, археи и низшие эукариоты. Электронно-микроскопические исследования показали, что бактериальное сообщество макрофитов представлено разными морфологическими формами клеток: от широко распространенных (палочек и кокков) до специфических форм (почкующиеся, простекающие, нитчатые бактерии, спирали) (Рыбакова, 2006).

Основная трудность в использовании молекулярного подхода состоит в корректном проведении стадии выделения суммарной ДНК из образцов смыва микробного сообщества с макрофитов: ДНК может адсорбироваться на взвеси, осаждающейся на растениях, выделяться совместно с ДНК других организмов. Кроме того, микроорганизмы, как правило, находятся в плотных скоплениях – агломератах. Существенное влияние на количество и качество выделенной ДНК бактерий оказывает также значительная концентрация и качественный состав органического вещества растений в окружающей среде (Zhou et al., 1996).

Для работы были взяты пробы обрастаний с тростника и рдеста в трех повторностях. Выделение ДНК и амплификацию на консервативных и групп-специфичных праймерах проводили, как описано выше в методической статье сборника (стр.53).

Результаты и обсуждение

Корректность проведения молекулярно-генетического анализа – залог получения адекватных данных, которые позволят выявить полную структуру микробного сообщества, выявить сходства и отличия близких по условиям окружающей среды или среды обитания, проанализировать особенности и закономерности формирования разнообразия в микробных ассоциациях. В данном исследовании приведены конкретные результаты, полученные при исследовании различных природных микробных сообществ, чтобы наглядно продемонстрировать всю цепочку практических действий: как был собран образец, как проанализирован, что получилось в результате и какие ошибки могут быть заложены в методически неправильно проведенной одной или нескольких операциях.

Микробные сообщества почв и донных осадков – экосистемы, наиболее активно изучаемые с помощью молекулярных методов. Трудность проведения молекулярных исследований связана не столько с проблемами,

возникающими при выделении тотальной ДНК и подготовкой ДНК для амплификации, сколько с тем, как адекватно и репрезентативно нужно отобрать пробу. Для выделения ДНК из одной пробы песчаного осадка взяли несколько фракций, отличающихся по структуре. Пробы обрабатывали одним методом. Результаты амплификации на групп-специфичных праймерах приведены на рисунке 1. Видно, что только для двух из четырех фракций получен одинаковый спектр ПЦР-продуктов, а остальные пробы различаются по набору ампликонов. Это пример демонстрирует, что при отборе проб осадков необходимо брать несколько повторностей материала, учитывая его структуру, а готовить смешанную пробу из них можно после выделения тотальной ДНК и проведения амплификации.

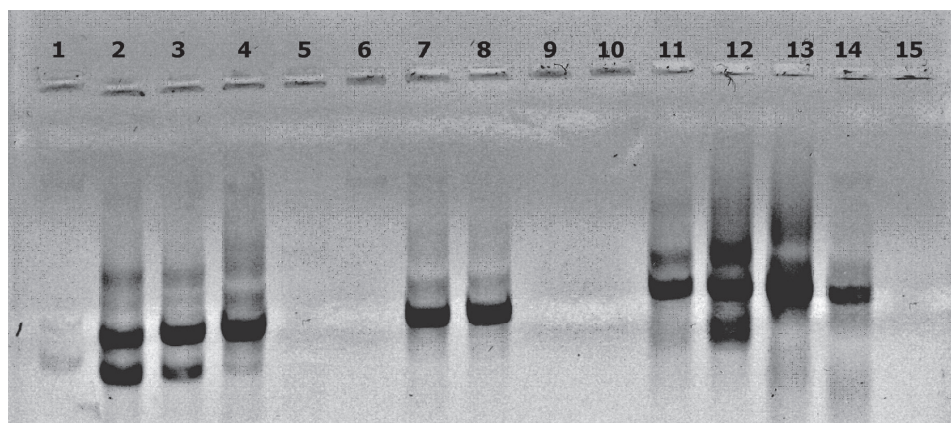


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации тотальной ДНК из проб донных осадков оз. Байкал (бухта Провал) в четырех повторностях: 1, 6, 11 – первая повторность, 2, 7, 12 – вторая, 3, 8, 13 – третья, 4, 9, 14 – четвертая, 5, 10, 15 – отрицательный контроль. Групп-специфичные праймеры: (1 – 5) классы Альфа- и Дельтапротеобактерии, (6 – 10) класс Бетапротеобактерий, (11 – 15) – домен Эубактерий.

При анализе проб другого типа – микробных ассоциаций из кишечной микрофлоры и обрастаний с макрофитов (рис. 2, 3), во всех экспериментах амплифицируется одинаковый спектр ПЦР-продуктов. Для сравнения спектра ампликонов брали препараты ДНК из сходных отделов кишечника разных особей черного байкальского хариуса и соскобы с разных частей

одного вида макрофита. Из рисунков видно, что вариации в таксономическом составе этих микробных ассоциаций незначительны.

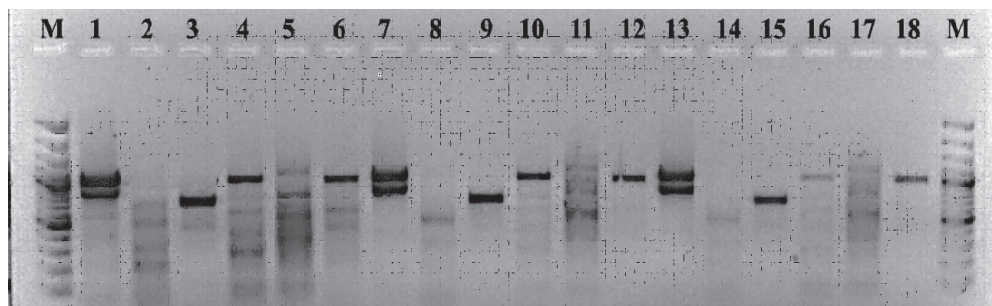


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации тотальной ДНК, выделенной из кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса в трех повторностях: 1–6 – первая повторность, 7–12 – вторая, 13–18 – третья, М – маркер ММ. Групп-специфичные праймеры: (1, 7, 13) – все эубактерии, (2, 8, 14) – все археи, (3, 9, 15) – филогенетическая линия *Proteobacteria*, классы *Alphaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria*, (4, 10, 16) – филогенетическая линия *Bacteroidetes*, (5, 11, 17) – филогенетическая линия *Planctomycetes*, (6, 12, 18) – филогенетическая линия *Firmicutes*, класс *Bacillus*.

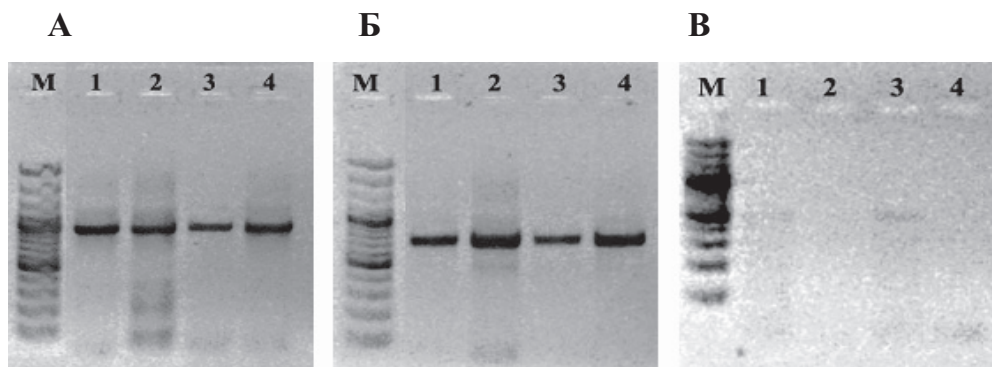


Рис. 3. Электрофорез продуктов амплификации тотальной ДНК из соскобов с макрофитов тростника (1, 2) и рдеста (3, 4), М – маркер ММ. Групп-специфичные праймеры: А – домен Эубактерий, Б – классы Альфа- и Дельтапротеобактерий, В – класс Бетапротеобактерий.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №08-04-98018p_сибирь_a, 09-04-00977a, Программы РАН №23, подпрограммы 1,

проект 23.13 (2009–2010 гг.), Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России».

Список литературы

1. Атлас Байкала / под ред. Галазия Г.И. М.: ФСГК, 1993. - 160 с.
2. *Белавская А.П., Кутова Т.Н.* Растительность зоны временного затопления Рыбинского водохранилища. // Труды Института биологии внутренних вод, Москва- Ленинград, «Наука», 1966, вып. 11 (14), с.162-189.
3. *Гаранкина В.П., Дагурова О.П., Дамбаев В.Б., Бурюхаев С.П.* Распространение и активность микроорганизмов в заливе Провал озера Байкал // Вестник Бурятского государственного университета. Вып. 4. Биология, география. – Улан-Удэ: издательство БГУ, 2009. – С. 84 – 88.
4. *Горбенко Ю.А.* Экология морских микроорганизмов перифитона. Киев: Наукова думка, 1977, 250 с.
5. *Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348 с.
6. *Инкина Г.А.* Бактерии, ассоциированные с частицами взвеси и бактериальные микроколонии в воде озер // Продукционно-гидробиологические исследования водных экосистем. Л.: Наука, 1987.
7. *Коврижных А.И.* Изучение процессов разложения остатков высшей водной растительности // Водные ресурсы , 1989, №6, с.110-115.
8. *Копылов А. И., Романенко А. В., Васильева М. И., Масленникова Т. С.* Микробиальные сообщества и микробиологические процессы в прибрежье Рыбинского водохранилища. // «Современная экологическая ситуация в Рыбинском и Горьковском водохранилищах: состояние биологических сообществ и перспективы рыборазведения». Ярославль. Изд-во ЯГТУ. 2000. С. 133-144.

9. *Кудрявцев В.М.* Бактерии в обрастаниях высших водных растений. // Гидробиол. ж., 1983, т. 19. №3, с. 60-67.
10. *Кулагин А.С., Помазкина Т.В.* Первичная продукция водоемов // Лимнология прибрежно-соровой зоны Байкала. Новосибирск: Наука, 1977. С. 148 – 155.
11. *Ляшенко Г.Ф.* Высшая водная растительность Рыбинского водохранилища. Автореф. дис. ... канд. наук СПб, 1995, 24 с.
12. *Мещерякова А.И., Верболова Н.В.* Гидрохимическая характеристика некоторых обособленных районов оз. Байкал // Лимнология прибрежно-соровой зоны Байкала. – Новосибирск: Наука, 1977. – С. 107 – 123.
13. *Намсараев Б.Б., Дагурова О.П., Бурюхаев С.П., Гаранкина В.П.* Гидрохимическая характеристика заливов восточной части озера Байкал // Вестник Бурятского государственного университета. Вып. 3. Химия, физика. Улан-Удэ: Издательство БГУ, 2008. С. 38 – 40.
14. *Намсараев Б.Б., Земская Т.И.* Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Наука, 2000. – 115 с.
15. *Правдин И.Ф.* Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с.
16. Руководство по изучению питания рыб в естественных условиях. – М.: Изд-во АН СССР, 1961. – 262 с.
17. *Рыбакова И.В.* Микрофлора перифитона макрофитов Волжского плеса Рыбинского водохранилища. //Биология внутренних вод, 2006, №2, с.13-18.
18. *Рыбакова И.В., Васильева М.И.* Микробиологическая характеристика мелководий Волжского плеса Рыбинского водохранилища // Международная конференция «Экологические проблемы бассейнов крупных рек-3», 2003 Тольятти, 15-19 сентября 2003 г., с.244.
19. *Чугунова Н. И.* Руководство по изучению возраста и роста рыб. – М.: Изд-во АН ССР, 1959. – 164 с.

20. Якубовский К.Б. О миграции биогенов в водоемах с участием высших водных растений //Первая Всесоюзная конференция по высшим водным и прибрежно водным растениям. Тезисы докладов. Борок, 1977.
21. Якушин В.М. Роль бактериопланктона в деструкции органических веществ в лотичных экосистемах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1997. 46 с.
22. Acinas S.G., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E. et al. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community // Nature (G. Brit.) 2004. V. 430. № 6999. P. 551–554.
23. Buller N.B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. – Oxfordshire: CABI publishing, 2004. – 361 p.
24. Haygood M.G. Light organ symbioses in fishes // Crit. Rev. Microbiol. 1993. V. 19. P. 191 – 216.
25. Haygood M.G., Distel D.L., Herring P.J. Polymerase chain-reaction and 16S-ribosomal-RNA gene-sequences from the luminous bacterial symbionts of 2 deep-sea anglerfishes // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1992. V. 72. P. 149 – 159.
26. Rochelle P.A., Fry J.C., Parkes R.J., Weightman A.J. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities // FEMS Microbiol. Lett. 1992. Vol. 79. No. 1–3. P. 59 – 65.
27. Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K.F., Gram L. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification // Aquaculture. 2000. V. 182. P. 1 – 15.
28. Van der Maarel M.J.E.C., Sprenger W., Haanstra R., Forney L.J. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 173. P. 189 – 194.
29. Zhou J., Bruns M.A., Tiede J.M. DNA recovery from soils for diverse composition // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 2. P. 316–322.

Селективная детекция живых организмов в природных ассоциациях молекулярно-генетическим методом

И.В. Рыбакова¹, Р.А. Федоров¹, И.П. Рябцева¹, В.Большаков¹,

Н.Л. Белькова^{2,3}

1 – *Институт биологии внутренних вод РАН*

2 – *Лимнологический институт СО РАН*

3 – *Иркутский государственный университет*

Высшая водная растительность с перифитоном, как поставщик различных органических и минеральных веществ, продуцируемых в период вегетации и особенно в период отмирания, является мощным фактором в процессах формирования гидрохимического режима водоемов. Благодаря своим морфологическим и экологическим особенностям, макрофиты играют значительную роль в определении структуры и численного состава прибрежных биоценозов, поэтому их следует рассматривать как основу, формирующую ценоз. Обрастания растений являются сложным и до сих пор мало изученным сообществом водных организмов. Микроорганизмы, входящие в состав перифитонных сообществ, играют существенную роль в биологических процессах круговорота веществ, вклад их в деструкционную деятельность бактериопланктона зарослей макрофитов может составлять 60–74% (Якушин, 1996).

В результате интенсивного развития микрофлоры на поверхности макрофитов фитофильная фауна погруженной их части наиболее разнообразна по видовому составу и богата населяющими ее организмами. Бактериальная пленка, покрывающая водные растения, влияет на прикрепление других организмов, водорослей, простейших, коловраток и т.д. Численность бактерий в перифитоне зависит от степени его развития. Этим обусловлены большие колебания в содержании бактерий на поверхности растений как на протяжении одного сезона, так и в разные сроки исследования. Так, летом растут грибы филлопланы, связанные с

прижизненными выделениями растений и предпочитающие для своего развития высокие температуры воды и воздуха. Осенью, когда температура понижается, растения отмирают, активно начинают развиваться грибы-деструкторы. Один комплекс сменяется другим. Численность дрожжей в течение вегетационного периода также изменяется в широких пределах. В июне они полностью отсутствуют, а в конце лета их количество достигает нескольких сотен тысяч клеток на грамм растительной массы. Наибольшее число дрожжей зафиксировано в середине августа и совпадает с началом периода разложения растений. Максимальная численность сапрофитных бактерий регистрируется в конце сентября – октябре (Михеева, 1970; Гаврилова, 1995).

В разные годы исследователи изучали в обрастаниях макрофитов микробные ассоциации разной физиологотрофической направленности. Олейник и Якушин (1979) исследовали распространение и динамику бактерий группы кишечной палочки, Одинцов и Лаптева (1984) – азотфиксирующую микрофлору и активность эпифитов. Другие авторы в перифитоне высших водных растений отмечали присутствие железо- и серобактерий (Родина, 1953; Филимонова, 1965), учитывали в огромных количествах микроорганизмы с амилалитическими и протеолитическими свойствами (Якушин, 1978), разрушающие клетчатку (Тимакова, 1984; Рыбакова, 2002), нитрификаторы и денитрификаторы (Рыбакова, 2002), а также способные окислять нефтепродукты (Рыбакова, 2003). Большая часть этих данных получена путем выделения микроорганизмов на селективных питательных средах. Однако традиционные методы анализа микробного сообщества различных экосистем позволяют выделять и учитывать лишь культивируемые формы микроорганизмов, т.е. не более 15% от общей численности бактерий (Amann et al., 1995). Применение молекулярно-биологических методов в микробиологии дает возможность более глубокого изучения микробных сообществ. Становится возможным идентифицировать микроорганизмы определенной экологической ниши, в том числе и

эпифитной микрофлоры макрофитов, изучить функциональные свойства этого сообщества.

Для понимания роли микробного сообщества в функционировании экосистемы важной характеристикой является определение активной его части. На примере Рыбинского водохранилища были установлены различия в численности активной части микрофлоры разных биотопов. По акватории водоема было определено содержание активных клеток в бактериопланктоне, которое составило 17–80% от общей численности бактерий. Установлено, что наиболее высокое содержание активных клеток – в агрегированном состоянии, а также в прибрежной зоне (Копылов, Крылова, 1993; Копылов, Косолапов, 1998).

Задача селективной детекции живых и жизнеспособных клеток организмов, в частности методами молекулярно-генетического анализа – одна из самых актуальных в настоящее время. Традиционно для изучения генетического разнообразия микроорганизмов в микробных сообществах проводят выделение тотальной ДНК, а для характеристики метаболически активных форм – РНК. Использование РНК в качестве целевой молекулы в молекулярно-генетических исследованиях сопряжено с рядом методических трудностей, в частности, известно, что время жизни некоторых молекул РНК – несколько минут. Однако возможность селективной детекции живых и жизнеспособных клеток в смешанных микробных ассоциациях имеет важное практическое значение при разработке методов мониторинга состояния водных объектов с помощью молекулярно-генетического анализа. Это может быть перспективным направлением практической реализации эффективного и высоко селективного подхода. Недавно для селективной инактивации внеклеточной ДНК было предложено использовать производные этидиумбромиды (Rudi et al., 2005, Nocker, Camper, 2006 и др.). Принципиальная схема этого подхода представлена на рисунке 1. Отличие

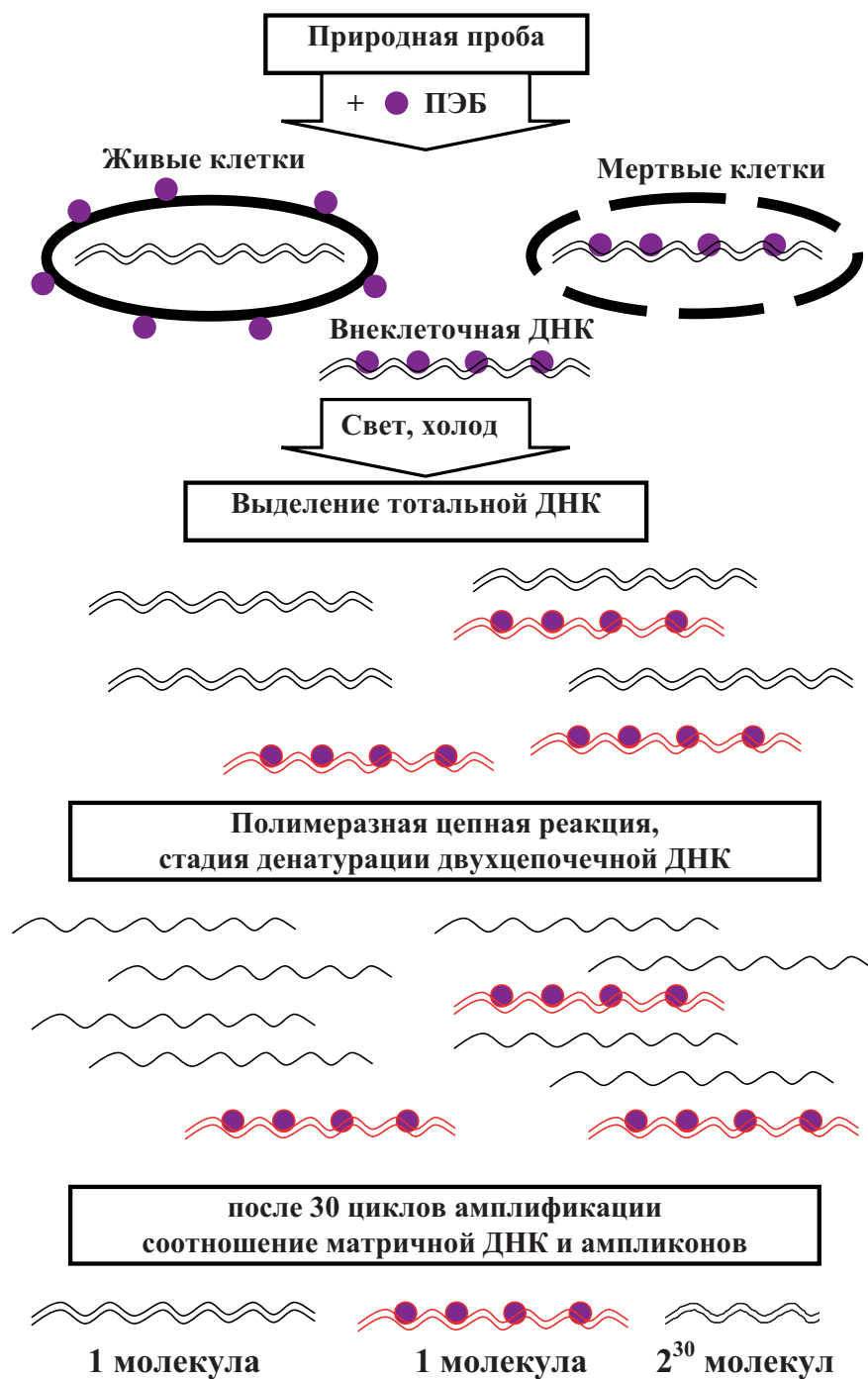


Рис. 1. Схема проведения эксперимента по селективной инактивации внеклеточной ДНК и ДНК мертвых бактериальных клеток производными этидиумбромид (ПЭБ) и последующей амплификации целевого фрагмента ДНК из живых клеток.

мертвых бактериальных клеток от живых заключается в необратимых изменениях структуры их клеточной стенки, которая становится проницаемой для внеклеточных компонентов среды. Производные этидиумбромида проникают внутрь таких клеток, интеркалируют в двухцепочечную ДНК и необратимо связываются с ней при освещении образца светом. При этом молекулы этидиумбромида не способны проникать внутрь живых и жизнеспособных клеток. На следующем этапе проводится выделение тотальной ДНК. В полимеразной цепной реакции нити ДНК, связанные производными этидиумбромида, не способны денатурировать и, следовательно, не участвуют в амплификации целевого фрагмента ДНК. Таким образом, можно селективно инактивировать не только внеклеточную ДНК, но и ДНК мертвых клеток.

Целью настоящего исследования стала апробация этого подхода для изучения генетического разнообразия ассоциаций, формирующихся в обрастаниях макрофитов Рыбинского водохранилища.

Материалы и методы

Для работы, в конце октября 2008 г., в мелководной зоне Волжского плеса Рыбинского водохранилища были отобраны пробы обрастаний с тростника обыкновенного (*Phragmites communis* Tin.). В стерильных лабораторных условиях в трех повторностях соскабливали стерильным скальпелем в трис-солевой буфер обрастания с тростника. Каждую пробу делили на две пробирки, одну использовали сразу для выделения тотальной ДНК, а во вторую добавляли 2 мкл моноазида этидиумбромида (ЕМА, 50 мкг/мл), освещали на льду лампой 650 ватт в течение 2 мин, выдерживали в темноте 5 мин, а затем проводили выделение тотальной ДНК методом ферментативного лизиса. Далее обработку проб вели, как описано выше в методической статье сборника (с.54).

Результаты и обсуждение

Ранее молекулярно-генетические методы были адаптированы нами для изучения генетического разнообразия перифитонных микроорганизмов (Рыбакова и др., 2009). Из необработанных моноазидом этидиумбромидом проб было получено большое разнообразие генотипов микроорганизмов (табл. 1). В перифитонном микробном сообществе, ассоциированном с тростником, определены представители четырех филогенетических линий микроорганизмов: Протеобактерии (классы альфа, бета, гамма и дельта), Цианобактерии, Chlamydia/Verrucomicrobia и Bacteroidetes/Chlorobi. Самую большую долю от общего числа проанализированных последовательностей (81%) составляли Протеобактерии, среди которых преобладают представители гамма-подгруппы (54%). Также следует отметить отсутствие явно доминирующего генотипа в перифитонном микробном сообществе. Все генотипы представлены небольшим числом последовательностей от 1 до 3, поэтому невозможно выделить доминирующие организмы. Генетическое разнообразие, полученное после инактивации внеклеточной ДНК, было значительно ниже (табл. 2, рис. 2). Следует отметить интересный факт – были получены последовательности ДНК некоторых эукариотических организмов (табл. 2). Нами ранее уже отмечалось, что пара праймеров, используемая для амплификации фрагмента гена 16S рРНК бактерий, высоко консервативна, а выбранный нами режим амплификации позволяет целенаправленно получать неспецифично большой набор фрагментов рибосомных генов (Белькова и др., 2008; Рыбакова и др., 2009).

Применение предложенного комплексного подхода перспективно для проведения экологических работ и мониторинга водных объектов.

Таблица 1. Результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей, полученных после молекулярно-генетического анализа обрастаний тростника без обработки проб ЕМА (Рыбакова и др., 2009).

Название посл-ти	Количество генотипов	Ближайший родственник (% гомологии)	Филогенетическая группа
B5-06-12	1	AB077986 <i>Rhodobacter</i> sp. (98.1%) AY947933 некульт. бактерия (99.3%)	Протеобактерии альфа-подгруппа
B5-06-15	1	EF636046 альфа-протеобактерия (94.7%) DQ787731 некульт. бактерия (95.7%)	Протеобактерии альфа-подгруппа
B5-06-28	1	EF140635 Эндосимбионт (86.1%) AF445716 некульт. бактерия (90.8%)	Протеобактерии альфа-подгруппа
B5-06-11	1	DQ664240 бета-протеобактерия (98.7%) DQ327689 некульт. бактерия (98.9%)	Протеобактерии бета-подгруппа
B5-06-22	1	AY429717 бета-протеобактерия (97.2%) AY424823 некульт. бактерия (98.5%)	Протеобактерии бета-подгруппа
B5-06-1	1	AF157695 <i>Enterobacter</i> sp. (91.7%) AM277069 некульт. бактерия (91.7%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-21, B5-06-27	2	AJ853889 <i>Enterobacter</i> sp. (96.5–99.8%) EF655641 некульт. бактерия (96.5–99.6%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-7, B5-06-23, B5-06-30	3	EF028122 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.9–100%) EF454402 некульт. бактерия (99.9–99.8%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-14	1	DQ453814 <i>Bacterium</i> sp. (96.8%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-26	1	EF471903 <i>Pseudomonas</i> sp. (92.9%) DQ321570 некульт. бактерия (93.0%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-16	1	EF428995 <i>Pseudomonas</i> sp. (95.3%) AY850288 некульт. бактерия (98.1%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-18	1	DQ295890 <i>Crenothrix</i> sp. (96.3%) AB240465 некульт. бактерия (96.0%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-10, B5-06-17	2	AJ414655 <i>Methylobacter</i> sp. (91.7–95.9%) EF125436 некульт. бактерия (92.3–96.4%)	Протеобактерии гамма-подгруппа
B5-06-33	1	AB246770 <i>Mycobacterium</i> sp. (91.2%) AY622263 некульт. бактерия (93.3%)	Протеобактерии дельта-подгруппа
B5-06-8	1	AM230484 <i>Flavobacterium</i> sp. (90.7%) EF516915 некульт. бактерия (92.0%)	Bacteroidetes/ Chlorobi
B5-06-19	1	DQ244076 <i>Niastella</i> sp. (94.1%) DQ004770 некульт. бактерия (97.8%)	Bacteroidetes/ Chlorobi
B5-06-4	1	X99392 <i>Opitutus</i> sp. (94.4%) EF516582 некульт. бактерия (99.5%)	Chlamydiae/ Verrucomicrobia
B5-06-31	1	AY493572 <i>Leptolyngbya</i> sp. (93.3%) DQ513910 некульт. бактерия (93.6%)	Цианобактерии

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей, полученных после молекулярно-генетического анализа обрастаний тростника с обработкой проб моноазидом этидиумбромидом. Указаны названия тех последовательностей, которые показали максимальную гомологию с ближайшими родственниками.

Название посл-ти	Количество генотипов	Ближайший родственник (% гомологии)	Филогенетическая группа
BT4-4	2	EU236739 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.6%)	Гамма-протеобактерии
BT4-6	1	M32704 <i>Ochromonas danica</i> (99.9 %) EF165108 <i>Ochromonas danica</i> (99.9%)	Eukaryota; Ochromonas
BT4-8	4	AY928243 Bacterium 5RO1 (99.1%) FJ542831 Некульт. <i>Xanthobacter</i> sp. (96.6%)	Альфа-протеобактерии
BT4-10	1	AF372806 Некультивируемый эукариот (79.8%)	Eukaryota
BT4-11	3	AY958971 Некульт. гамма-протеобактерия (99.1%)	Гамма-протеобактерии
BT4-12	1	AB218348 Некульт. <i>Lentisphaerae</i> (97.7%)	Chlamydiae/ Verrucomicrobia
BT2-16	3	AJ586561 <i>Acricotopus lucens</i> (94.5%)	Eukaryota; Acricotopus
BT2-17	3	AF050530 Некульт. гамма-протеобактерия (97.3%)	Гамма-протеобактерии
BT2-22	2	EU564843 <i>Nitratireductor</i> sp. (95.6 %) FJ542966 Некульт. альфа-протеобактерия (95.2%)	Альфа-протеобактерии

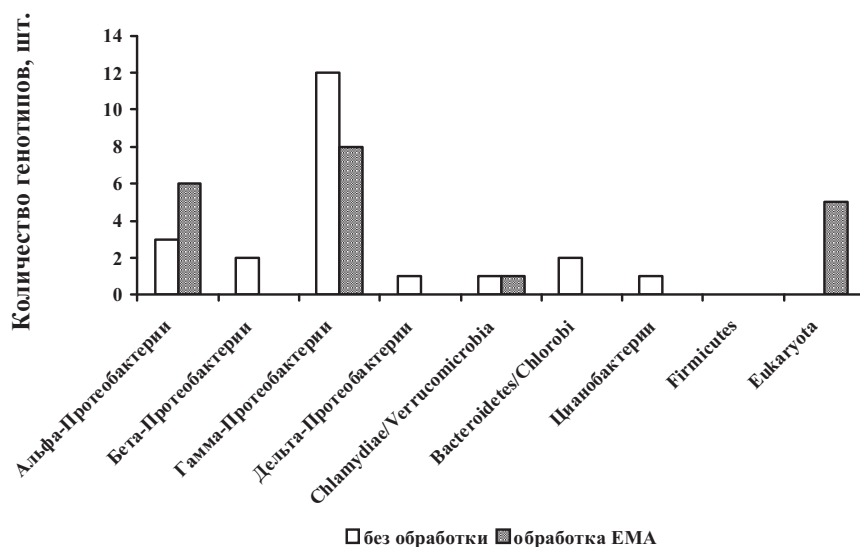


Рис. 2. Диаграмма сравнительного разнообразия генотипов, полученного из соскобов тростника обработанных и не обработанных моноазидом этидиум бромидом.

Работа поддержана грантом РФФИ №09-04-00977, интеграционным проектом СО РАН №122, Программой фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России».

Список литературы

1. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В., Ханаева Т.А. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами // Биология внутренних вод. 2008. №2. С. 91 – 94.
2. Гаврилова В.А. Сезонная динамика бактерий, микромицетов и дрожжей на листьях *Viburnum umbellatus* L. // Тезисы IV Всерос.конф. по водным растениям. Борок, 1995. С.26.
3. Копылов А. И., Косолапов Д. Б. Характеристика различных биотопов Рыбинского водохранилища по общей численности и количеству

- бактерий, содержащих нуклеотиды // Микробиология, 1998, Т. 67, №6, с. 859-864.
4. *Копылов А. И., Крылова И. Н.* Структура бактериопланктона Рыбинского водохранилища // Современное состояние экосистемы Рыбинского водохранилища. Спб.: Гидрометеиздат, 1993. с. 141-173.
 5. *Михеева И. В.* Сапрофитная микрофлора высших водных растений рыбоводных водоемов // Микология и фитопатология. 1970, 4, 1. с. 8-13.
 6. *Одинцов В. С., Лаптева Н. А.* Азотфиксирующая активность эпифитов на некоторых макрофитах Японского моря // Биология моря, 1984, №1. с. 60-62.
 7. *Олейник Г. Н., Якушин В. М.* Численность бактерий кишечной группы на высших водных растениях каналов УССР // Гидробиол. журн. 1979. Т. 15, №1. с. 60-63.
 8. *Родина А.Г.* Развитие железобактерий при зеленом удобрении рыбоводных прудов // Микробиология. 1953. Т. 22. Вып. 2. С. 171-178.
 9. *Рыбакова И. В.* Бактериальное сообщество перифитона макрофитов Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод, 2002, №4, с. 99-101.
 10. *Рыбакова И. В.* Нефтеокисляющие микроорганизмы в перифитоне макрофитов Рыбинского водохранилища // Матер. всерос. научно-практич. конф. «Физиология растений и экология на рубеже веков». Ярославль, 26-28 мая 2003 года. Ярославль, 2003. с. 173.
 11. *Рыбакова И.В., Белькова Н.Л., Лаптева Н.А., Суханова Е.В.* Адаптация молекулярно-генетических методов для изучения таксономического разнообразия микробных сообществ, ассоциированных с макрофитами // Биология внутренних вод. 2009. №1. 102 – 110.
 12. *Тимакова Т. М.* Разложение клетчатки в Ивановском и Угличском водохранилищах // Биологическая продуктивность и качество воды Волги и ее водохранилищ. 1984, М., «Наука». С. 123-124.

13. *Филимонова Н.А.* Бактериопланктон и бактериальный перифитон в различных биотопах Сямозера // Микробиология. 1965. Т. 34. Вып. 1. С. 133-139.
14. *Якушин В. М.* Развитие бактерий среди зарослей и в перифитоне тростника в Северо-Крымском канале // Гидробиол. журн., 1978, 14, №4. с. 36-40.
15. *Якушин В. М.* Роль перифитона высших водных растений в деструкции органического вещества // Гидробиол. журн. 1996. Т. 32. ¹ 2. С. 41-47.
16. *Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.* Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. 1995. Vol. 59. P. 143 – 169.
17. *Nocker A., Camper A.K.* Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. No. 3. P. 1997 – 2004.
18. *Rudi K., Moen B., Droemtorp S.M., Holck A.L.* Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. No. 2. P. 1018 – 1024.

Влияние условий первичной обработки водных проб на разнообразие получаемых генотипов на примере микробных сообществ пресного озера Арахлей (Забайкалье)

Е.Б. Матюгина¹, Н.Л. Белькова^{2,3}

1 – *Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН*

2 – *Лимнологический институт СО РАН*

3 – *Иркутский государственный университет*

Приоритетными факторами, обуславливающими формирование облика водных экосистем, являются морфометрические и гидрохимические характеристики водоема. Система Ивано-Арахлейских озер – одна из крупных озерных систем Забайкалья – расположена на водоразделе Ленского и Ангара-Енисейского бассейнов. Озеро Арахлей является наибольшим по площади – 5900 га, с максимальной глубиной 17,0 м (рис. 1).



Рис. 1. Карта-схема расположения системы Ивано-Арахлейских озер.

Озеро характеризуется колебаниями температуры воды в течение всего года от 0,5 до 25,2°C, длительным ледоставом, прямой стратификацией в летний и обратной в подледный период. Основным своеобразием годового термического цикла озера является ранний нагрев водных масс от проникающей солнечной радиации, несмотря на большую толщину ледяного покрова и низкую температуру воздуха в период ледостава (Обязов и др., 2002). Озеро Арахлей содержит наименьшее количество сестона в воде: в период открытой воды прозрачность по диску Секки изменяется в пределах 5–9 м, а зимой до 11 м. Концентрация растворенного кислорода в течение годового цикла в воде озера колеблется от 5,5 до 16,5 мг O₂/л (53–123,8% насыщения). В зимний период в водах озер отмечается пик концентрации растворенного кислорода 16,0 мгO₂/л (121,0 % насыщения), что обусловлено подледной вегетацией всех форм растительности. Максимальные значения pH характерны для лета, минимальные – для зимы. По ионному составу озерные воды гидрокарбонатные, сульфатно-гидрокарбонатные магниевые-кальциевые, натриево-магниевые-кальциевые. Вода озера характеризуется низким содержанием растворенного органического вещества (ОВ): перманганатная окисляемость – 4,1 мг O₂/л, бихроматная – 9,3 мг O₂/л. Сезонные колебания концентрации биогенных элементов характеризуются максимумом в зимне-весенний период (Усманов и др., 2002). По трофности озеро относится к мезотрофному типу, но в зависимости от периода водности и сезона года может иметь олиготрофные и эвтрофные участки.

Изучение микробного сообщества оз. Арахлей проводится с 1963 г. классическими микробиологическими методами (Шишкина и др., 1967; Шишкина, 1970; Тополов, 1981, 1982). Согласно общепринятым методикам выделенные штаммы бактерий изучались по морфофизиологическим свойствам. Видовой состав микроорганизмов оз. Арахлей представлен известными и широко распространенными в озерах средних широт родами. Доминирующие гетеротрофные микроорганизмы водной толщи принадлежат

родам *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Caulobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. Видовой состав микроорганизмов в грунтах озера в значительной степени зависит от типа донных отложений. Среди доминирующих бактерий в донных отложениях озера отмечаются представители следующих родов: *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Leptothrix*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Sarcina*, *Siderocapsa*, *Spirillum*, *Pseudomonas*, *Thiospira*, а также дрожжи из родов *Cryptococcus* и *Rhodotorula* (Матюгина, 2002). Проведение ежегодных экологических исследований показало, что наибольшее разнообразие видового состава культивируемых гетеротрофных микроорганизмов и максимальные значения общей численности совпадали с максимумом первичной продукции органического вещества и отмечались в зоне термоклина и придонных слоях озера. Эти зоны включают наибольшее количество экологических ниш, что определяется сочетанием основных факторов, влияющих на внутриводоемные процессы – поступление биогенных элементов, проникновение света и аэробность водных масс. Поэтому большое разнообразие микроорганизмов в этих зонах является следствием выполнения основной их функции в водоемах – проведение полной деструкции органического и минерального вещества.

Применение молекулярно-генетических методов для исследования микробных сообществ водных экосистем дает возможность получить дополнительную информацию об их структурно-функциональном разнообразии и позволяет изучать разнообразие микробных сообществ непосредственно в природных образцах, минуя стадию культивирования микроорганизмов. На сегодняшний день, таксономия микробных сообществ пресных водоемов Забайкалья изучена сравнительно слабо, особенно ее некультивируемая составляющая.

Цель данного исследования – оценка влияния разных способов первичной обработки бактериального материала на разнообразие генотипов,

полученных после проведения стандартизированных процедур выделения тотальной ДНК, амплификации и клонирования.

Материалы и методы

Для выделения суммарной ДНК были использованы пробы воды, отобранные из придонного горизонта центральной станции оз. Арахлей. Анализируемая проба представляла собой собственно водную часть и примеси тонкодисперсного ила. Пробы отбирались в трехкратной повторности стерильным батометром Молчанова в стерильные фальконы объемом 100 мл. В полевых условиях пробы делили на 2 части. Одну часть сразу же фиксировали спиртом до конечной концентрации 70%. В лабораторных условиях пробы природной воды фильтровали через стерильные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore). Затем фильтры помещали в стерильные пробирки эппендорф и обрабатывали 400 мкл лизирующего раствора (РИБО-сорб, ДНК-сорб, «АмплиСенс», Москва). Дальнейшую обработку вели, как описано выше в методической статье сборника (стр.53).

Результаты и обсуждение

В работе была использована одна проба бактериального материала, которую делили на несколько повторностей и варьировали способ первичной обработки в полевых условиях. При работе с микробными сообществами принципиальным является момент правильного отбора проб и их немедленная фиксация. Микроорганизмы обладают двумя очень важными характеристиками, которые с одной стороны способствуют их выживанию в практически любых экологических условиях, а с другой стороны, накладывают строгие требования при проведении пробоотбора: (1) это чрезвычайно адаптивные организмы, обитают в самых разнообразных

природных и искусственно созданных человеком условиях, (2) характеризуются высокой скоростью роста. При отборе проб, особенно водных, происходит изменение условий обитания микробных сообществ и можно наблюдать быструю ответную реакцию – рост одних и угнетение других бактерий, причем трудно однозначно заключить, являлись ли быстро размножающиеся формы действительно доминантными в природной среде. Таким образом, хранение водных проб более нескольких часов, даже в условиях, максимально приближенных к природным, может давать некорректную характеристику разнообразия микроорганизмов. Этот, казалось бы, очевидный факт, к сожалению, часто игнорируется при проведении отбора водных проб для микробиологических исследований. Мы целенаправленно поставили задачу продемонстрировать различия в составе основных генотипов в двух повторностях одной пробы, обработку которых в полевых условиях проводили по-разному. Всего было получено 30 последовательностей длиной от 542 до 895 пар оснований (п.о.). Из рисунка 2 видно, что наибольшее количество генотипов получено в обоих случаях из класса Дельта-протеобактерии. Однако очевидно, что в целом детектируются разные группы микроорганизмов. Следует отметить, что генотипы, полученные из фиксированной воды, принадлежат к тем филогенетическим группам, в которых преимущественно определены последовательности именно некультивируемых организмов, они получены аналогичными молекулярно-генетическими методами из природных микробных сообществ: Нитроспира, Бактероиды-Хлороби и Зета-протеобактерии. Эти группы содержат несколько культивируемых представителей и в настоящее время разрабатываются методы и подходы для их культивирования в лабораторных условиях. Из нефиксированной воды получены генотипы известных культивируемых гетеротрофных организмов классов Альфа- и Бета-протеобактерии, Актинобактерии.

Таким образом, хранение водной пробы без первичной обработки бактериального материала приводит к изменению состава микробного

сообщества и детекции преимущественно известных представителей культивируемых гетеротрофных микроорганизмов.

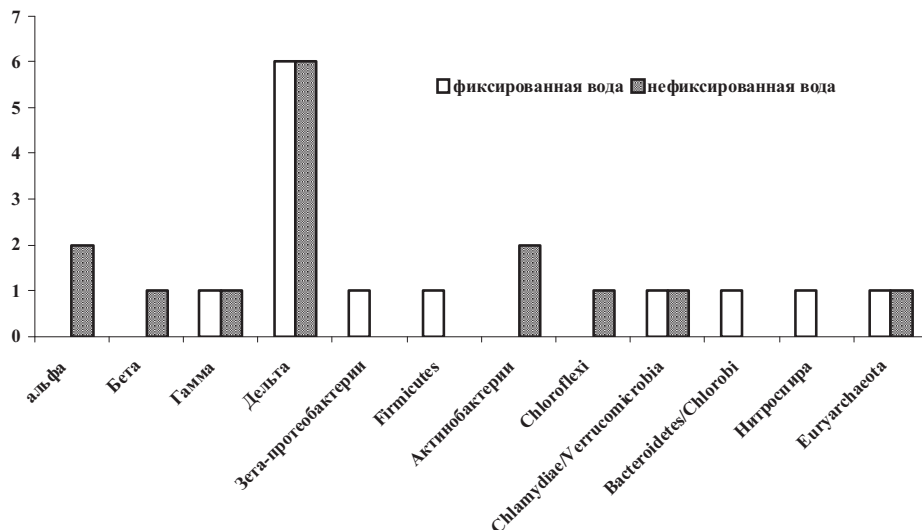


Рис. 2. Разнообразие генотипов, полученное из проб фиксированной и нефиксированной воды из придонного слоя оз. Арахлей.

Работа поддерживается грантом РФФИ №09-04-00977, интеграционным проектом СО РАН №122.

Список литературы

1. Матюгина Е.Б. Микробные сообщества в озерных экосистемах Забайкалья // Материалы II междунар. научн. конф. «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды» - Нарочь: Изд-во БГУ, 2003 – С. 179-182.
2. Обязов В.А., Усманов М.Т., Жилин В.Н. Гидрология // Иванов-Арахлейский заказник: природно-ресурсный потенциал территории. – Чита: Поиск, 2002. – С. 21-27.
3. Тополов А.А. Изменение численности и состава гетеротрофных бактерий оз. Арахлей в 1975-1976 гг. // «Биологическая продуктивность озера Арахлей (Забайкалье)». Новосибирск: Наука, 1981, - С.46-54.

4. *Тополов А.А.* Микрофлора грунтов Ивано-Арахлейских озер и ее роль в донном газоотделении. Автореф. дис. канд. биол. наук. - Иркутск, 1982. - 18 с.
5. *Усманов М.Т., Жилин В.Н.* Характеристика гидрохимических параметров // Ивано-Арахлейский заказник: природно-ресурсный потенциал территории. – Чита: Поиск, 2002. – С. 66-70.
6. *Шишкина К.А.* Сравнительная микробиологическая характеристика озер Ивано-Арахлейской группы (Забайкалье). Автореф. дис. канд. биол. наук. - Иркутск, 1970. - 18 с.
7. *Шишкина К.А., Бондарева Е.И., Шишкин Б.А.* Численность, время генерации и продукция бактериопланктона в озерах Иргень, Иван и Арахлей в подледный период // Вестник научн. информации Забайкальск. фил. Геогр. общ-ва СССР. - Чита, 1967. - Вып. 8. – С. 40-46.

Генетическое разнообразие микробных сообществ подземных вод с разным типом минерализации

Н.М. Кашеварова¹, Н.Л. Белькова²

1 - Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

2 - Лимнологический институт СО РАН

Лечебное действие природных минеральных вод на организм человека к настоящему времени изучено достаточно полно и подтверждено многочисленными экспериментально-клиническими исследованиями (Современная бальнеофизиотерапия, 2005). Основными факторами, обуславливающими лечебные эффекты минеральных вод, являются минерализация и химический состав воды, наличие фармакологически активных веществ, антимикробная активность. В настоящее время антимикробную активность минеральных вод связывают с присутствием в них автохтонной микрофлоры, продуцирующей в результате жизнедеятельности органические компоненты – продукты метаболизма (кислоты, пигменты, бактериоцины). Высвобождающиеся при разрушении микробных клеток структурные компоненты (элементы бактериальной стенки и органоиды) также вносят свой вклад в антимикробные эффекты минеральных вод. Однако, микробное разнообразие природных минеральных вод изучено слабо. Имеются данные о присутствии в минеральных водах углеводородокисляющих, сульфатредуцирующих, аммонифицирующих, тионовокислых бактерий, железобактерий, нитрификаторов. В питьевой лечебно-столовой воде "Усть-Качкинской" обнаружены неферментирующие грамотрицательные бактерии (3–10 КОЕ/л). Выделенная из этой воды чистая культура по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам была отнесена к *Flavobacterium odoratum* (Маслов, 2004).

Бальнеологический курорт «Усть-Качка» расположен в 54 км от одного из старейших на Урале культурных и промышленных центров – города Перми, вдали от промышленных предприятий, в экологически

благоприятной зоне на левом берегу реки Кама, среди живописного соснового бора. Уникальность курорта состоит в том, что его гидроминеральная база представлена тремя видами лечебных минеральных вод: бромйодной, сероводородной и лечебно-столовой "Усть-Качкинской", используемыми для наружного и внутреннего применения. Минеральные воды выведены скважинами с разных глубин. Лечебно-столовые питьевые воды вскрываются в водоносном горизонте, приуроченном к терригенным отложениям (песчаникам, алевролитам) шешминского горизонта уфимского яруса верхней перми. Интервал эксплуатации горизонта находится в пределах глубин 30,65–44,15 м. Сероводородные хлоридно-натриевые рассолы, обогащенные бором и бромом, приурочены к сакмаро-артинскому водоносному горизонту нижней перми; водовмещающими являются загипсованные карбонатные отложения. Интервал эксплуатации 294–471 м. Бромные хлоридно-натриевые крепкие рассолы с повышенным содержанием йода и бора вскрывают терригенные песчано-глинистые отложения нижнего карбона на глубине 1294–1329 м.

Физико-химические характеристики минеральных вод. Питьевые лечебно-столовые воды относятся к среднеминерализованным (M 5,0–10,0 г/л) сульфатно-хлоридным кальциево-натриевым (Cl 54–66, SO_4 30–40, Na 54–72, Ca 20–30 мг-экв.%). В состав воды входят такие микрокомпоненты лечебного действия как кремниевая кислота (H_2SiO_3 17 мг/л), бром и бор, однако их содержание не достигает принятых в России бальнеологических норм ($H_2SiO_3 \geq 50$, $Br \geq 25$, $H_3BO_3 \geq 35$ мг/л).

Сероводородные воды представляют крепкие борные хлоридные натриевые рассолы с повышенным содержанием брома (M 69–82 г/л, Cl 85–95, SO_4 3,5–10,0, Na 85–90, Ca 5,5–7,0, Mg 4,5–9,0 мг-экв.%). Из терапевтически активных компонентов, кроме сероводорода, являющегося основным лечебным фактором (285–375 мг/л), в воде содержится в кондиционном количестве бор (H_3BO_3 315–550 мг/л). В заметных количествах присутствует также бром (Br 40–45 мг/л), однако при

разбавлении сероводородных рассолов до принятых в бальнеотерапии концентраций сероводорода и солей, содержание брома уменьшается и не достигает бальнеологической нормы.

В бромных хлоридных кальциево-натриевых крепких рассолах с повышенным содержанием йода и бора (М 234–294 г/л, Cl 99–100, Na 45–75, Ca 15–40, Mg 7–14 мг-экв.%) из терапевтически активных микрокомпонентов содержатся бром (Br 680–765 мг/л), йод (I 5,5–13,0 мг/л), бор (H_3BO_3 70–115 мг/л) и железо (ΣFe 45–135 мг/л).

Реакция среды в исследуемых водах колеблется от слабокислой (бромный рассол) до слабощелочной (питьевая лечебно-столовая вода). Температура изученных типов минеральных вод отличается незначительно (7–8°C). В сероводородной воде кислород не обнаружен, тогда как его содержание в бромном рассоле и лечебно-столовой воде составляет соответственно 0,72 и 2,32 мг/л.

Питьевая лечебно-столовая вода используется, кроме внутреннего применения, в виде местной терапии (микроклизмы, орошения, промывания). Сероводородные воды рекомендуются для наружного применения в виде различных бальнеотерапевтических процедур при соответствующем разведении пресной водой до необходимой лечебной концентрации. В разведенной воде сохраняется кондиционное содержание сероводорода и бора, но решающим в определении медицинских показаний для применения данной минеральной воды является наличие в ней сероводорода. Сероводород имеет биогенное происхождение за счет развития сульфатредуцирующих бактерий, а концентрация сероводорода в водах предопределяется наличием благоприятных условий для жизнедеятельности этих бактерий.

Бромные рассолы рекомендуется использовать для наружных бальнеопроцедур при соответствующем разведении пресной водой до нужной концентрации. При этом кондиционным следует считать лишь

содержание брома, превышающее и при разбавлении бальнеологическую норму, а йод и бор при этом не достигают нормы.

Данных по изучению генетического разнообразия микроорганизмов подземных вод курорта "Усть-Качка" к настоящему времени нет. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение генетического разнообразия природных микробных сообществ минеральных лечебных вод, отобранных с разных глубин.

Материалы и методы

Отбор проб и фиксация бактериального материала. Пробы воды были отобраны из скважин №№ 1/99, 3, 4 в ноябре 2007 г. 0,25–3 л минеральной воды (в зависимости от минерального состава) фильтровали на 0,22-микронные фильтры (нитроцеллюлозные или поликарбонатные (Millipore, HAWP) или ацетатцеллюлозные (Vladisart)). Для выделения суммарной ДНК фильтры разрезали на сектора и фиксировали лизирующим раствором (набор РИБО-сорб, «АмплиСенс», Москва) или 80% этанолом и до выделения ДНК хранили в холодильнике при 4°C. Кроме того, фильтры обрабатывали 1 мл трис-солевого буфера (10 mM трис-HCl, pH 7.5; 0.1 M NaCl; 2 mM ЭДТА) и замораживали при –20°C. Дальнейшую обработку проб проводили, как описано в методической статье данного сборника (стр.53).

Результаты и обсуждение

Всего было получено 6 проб тотальной ДНК, с которых пять ПЦР-продуктов использовали в реакцию лигирования. Расшифрованы нуклеотидные последовательности 60 полноразмерных вставок. Сравнительный анализ показал, что максимальное разнообразие бактерий выявлено в питьевой лечебно-столовой воде (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ полученных последовательностей с имеющимися в EMBL-базе данных.

Название последовательности (количество клонов)	Длина (п.о.)	Ближайший гомолог (процент гомологии)	Филогенетическая группа
Последовательности из питьевой лечебно-столовой воды			
РИБО-сорб, 52°C			
P1-1_05	898	AJ511275 <i>Desulfocapsa</i> sp. (97.9%)	Дельта-протеобактерии
P1-1_07 (3)	880	AF228136 <i>Desulfomicrobium</i> sp. (92.2%)	Дельта-протеобактерии
P1-1_11	901	AJ012591 Сульфат-редуцирующая бактерия (94.2%)	Дельта-протеобактерии
P1-1_02	900	DQ083114 Некультивируемый клон (98.0%)	Дельта-протеобактерии
P1-1_10	896	AF529359 Некультивируемая бета-протеобактерия (99.4%)	Бета-протеобактерии
P1-1_08 (2)	898	AY082482 <i>Desulfosporosinus</i> sp. (98.6%)	Firmicutes
P1-1_09	888	EF442983 Некультивируемый клон (90.1%)	Division OD1
P1-1_01 (2)	888	DQ676452 Некультивируемый клон (90.1%)	Division OD1
Ферментативный лизис, 52°C			
P1-2_1	677	AY030314 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.1%)	Гамма-протеобактерии
P1-2_4	787	AB248284 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.1%)	Гамма-протеобактерии
P1-2_7 (3)	778	AM411059 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.9%)	Гамма-протеобактерии
P1-2_5	763	AY131216 <i>Stenotrophomonas</i> sp. (97.4%)	Гамма-протеобактерии
P1-2_10	782	EU014685 <i>Salmonella</i> sp. (99.2%)	Гамма-протеобактерии
P1-2_11	787	EU236245 Некультивируемый клон (98.0%)	Бета-протеобактерии
P1-2_6 (3)	762	AY082482 <i>Desulfosporosinus</i> sp. (98.4%)	Firmicutes
P1-2_16	642	AB245336 <i>Solirubrobacter</i> sp. (88.4%)	Актинобактерии
P1-2_12	364	AJ867628 Некультивируемый клон (86.0%)	Euryarchaeota
Последовательности из сероводородной воды			
РИБО-сорб, 52°C			
P2-1_1 (9)	895	EF207157 <i>Desulfotignum</i> sp. (99.3%)	Дельта-протеобактерии
P2-1_4 (7)	895	AJ251623 <i>Desulfomicrobium</i> sp. (92.4%)	Дельта-протеобактерии

Ферментативный лизис, 52°C			
P2-2_4 (2)	503	CP000712 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.0%)	Гамма-протеобактерии
P2-2_10 (3)	635	CP000644 <i>Aeromonas</i> sp. (94.6%)	Гамма-протеобактерии
P2-2_8 (4)	643	AJ430343 <i>Comamonas</i> sp. (93.8%)	Бета-протеобактерии
Последовательности из йодо-бромной воды			
РИБО-сорб, 52°C			
P3-1_5 (5)	895	AM396914 <i>Pseudomonas</i> sp. (99.9%)	Гамма-протеобактерии
P3-1_14	581	AY152673 <i>Pseudomonas</i> sp. (95.4%)	Гамма-протеобактерии
P3-1_12 (2)	638	X70955 <i>Pelobacter</i> sp. (81.1%)	Дельта-протеобактерии

Разнообразие представлено микроорганизмами четырех таксономических групп эубактериального домена: классы гамма-, бета- и дельтапротеобактерий, вирмикуты, актинобактерии и фантомной линии OD1, и одной архебактериальной группы (Euryarchaeota). Следует отметить, что процент гомологии последовательностей варьирует в очень широком диапазоне значений от 81,1 до 99,0 % с известными представителями из EMBL-банка данных. В сероводородной воде обнаружены представители двух родов дельта-, четырех родов гамма- и одного рода бета-протеобактерий. Наименьшее микробное разнообразие было выявлено в глубинной йодо-бромной воде и представлено только гамма- и дельта-протеобактериями. Йодобромная вода отличалась по своим физико-химическим свойствам от других вод тем, что в этой воде отмечена более высокая минерализация. Вероятно, именно поэтому не удалось получить достаточно хорошо очищенную ДНК для полимеразной цепной реакции методом ферментативного лизиса. Для лигирования из этой пробы удалось получить только один ПЦР-продукт. В целом, можно заключить, что с увеличением глубины залегания подземных вод, возрастанием степени минерализации уменьшается их микробное разнообразие (рис. 1). Интересно сравнить результаты, полученные разными методами выделения ДНК (рис. 2).

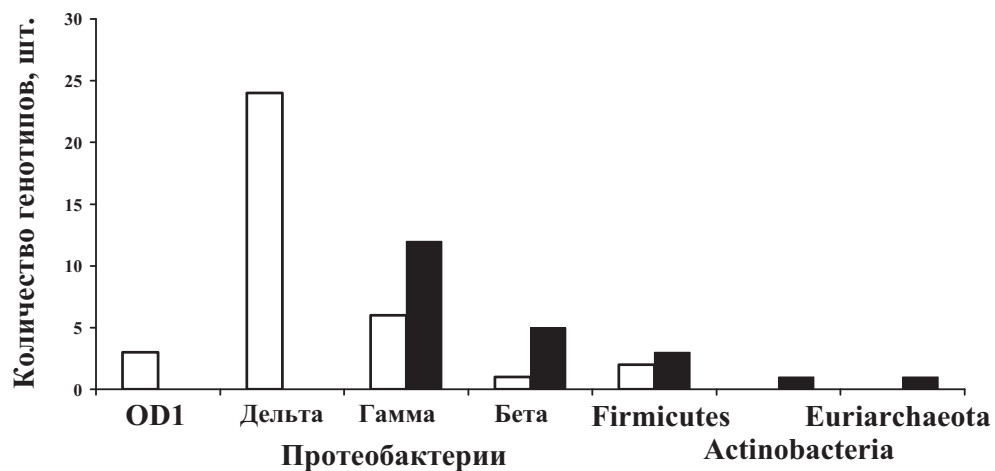


Рис. 1. Разнообразие генотипов, полученное из всех проб воды после выделения геномной ДНК разными методами:

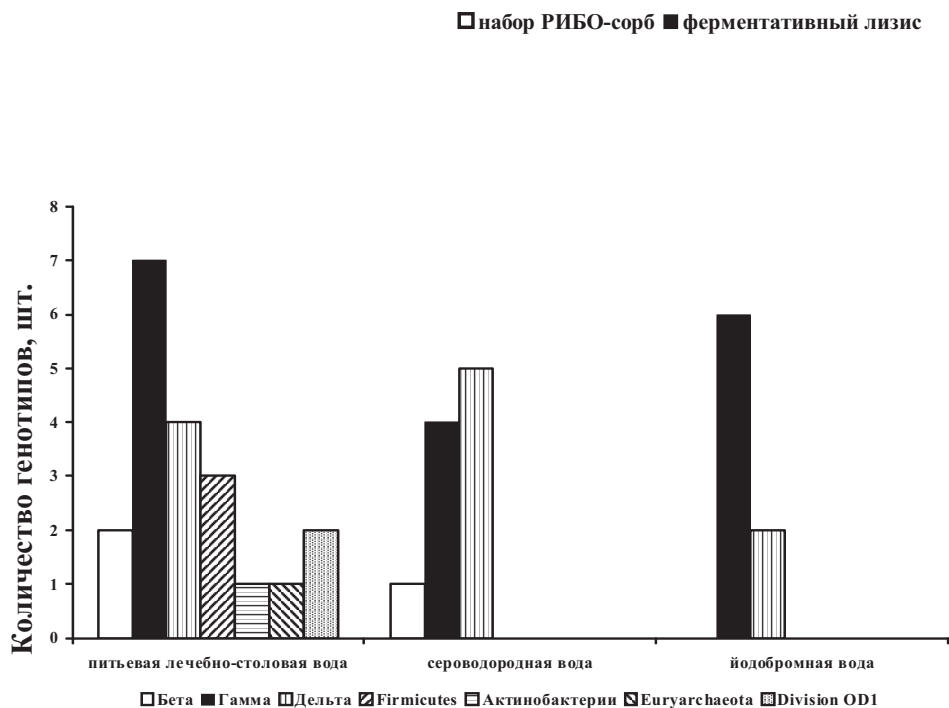


Рис. 2. Разнообразие генотипов, полученное из проб воды.

Очевидно, что разные способы лизиса биологического материала и проведения всех дальнейших процедур очистки и осаждения ДНК позволяют выделять геномный материал из разного спектра микроорганизмов. В дальнейшем необходимо учитывать этот аспект при проведении молекулярно-генетического анализа природных микробных сообществ.

Список литературы

1. Современная бальнеофизиотерапия / Коллектив авторов / под ред. Е.В. Владимирского. Пермь: изд-во ПГТУ, 2005. 234 с.
2. *Маслов Ю.И.* Клинико-экспериментальное обоснование применения минеральной воды "Усть-Качкинская" в бальнеологической практике: Автореф. дисс. докт. мед. наук. Пермь, 2004. 45 с.

Учебно-методическое пособие

**РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ
ВНУТРЕННИХ ВОДОЕМОВ РОССИИ**

Подписано в печать 5.12.2009. Формат 70х100/16.

Гарнитура "Times New Roman".

Бумага офсетная. Тираж 120 экз. Заказ №1462.

Усл. печ.л. 8,0

Отпечатано в ООО "Принтхаус"

150000, Россия, г. Ярославль, ул. Свободы, 12Б,

(4852) 73-04-74, 30-49-80

e-mail: printhouse-yar@yandex.ru, print_house-06@inbox.ru

www.printhouse.yar.ru