

# АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

В.С. Микрюков

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург

*Ключевые слова: грибы, загрязнение, почвенный метагеном, разнообразие, T-RFLP.*

Благодаря незаменимой роли микроорганизмов в наземных экосистемах, анализ разнообразия их сообществ, особенно в почве, считается одной из приоритетных проблем экологии (Bardgett et al., 2008). Для оценки и характеристики гигантского разнообразия микроорганизмов и анализа их взаимодействий с биотическими и абиотическими факторами окружающей среды особенно перспективны молекулярно-генетические подходы, которые не требуют получения чистых культур микроорганизмов. Эти подходы позволяют получить профиль сообществ, представленный набором так называемых «операциональных таксономических единиц» (operational taxonomic unit, OTU) или филотипов — групп последовательностей ДНК или РНК, обладающих высоким сходством (Schloss, Westcott, 2011). Наиболее распространены методы, с помощью которых можно избирательно анализировать в большом количестве проб отдельные таксономические группы организмов (микоризообразующие грибы, археи, отдельные группы эубактерий и т.д.), например с использованием генов и межгенных спейсеров рДНК. В последнее время также стало возможным характеризовать сообщества с точки зрения потенциальной функциональной активности организмов по разнообразию генов отдельных ферментов (таких, как нитрат- и нитритредуктаза, марганец пероксидаза, рибулозодифосфаткарбоксилаза и др.). Другими словами, стала возможной оценка разнообразия отдельных функциональных групп микроорганизмов, необходимая для раскрытия механизмов связи «разнообразие — функционирование».

Обилие праймеров, разработанных для различных групп организмов и представленных в литературных источниках, с одной стороны, обеспечивает свободу выбора для анализа разнообразия, а с другой — при их разнокачественности и разнообразии других условий анализа (положение флуоресцентной метки, выбор эндонуклеазы рестрикции) возникает необходимость тщательного подбора наиболее оптимальных комбинаций «группа организмов — пара праймеров» для конкретных образцов (лесная подстилка, донные отложения и т.д.).

Основная цель данной работы — осуществить подбор лучших комбинаций праймеров и эндонуклеаз рестрикции для основанного на изучении полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов ДНК (T-RFLP, terminal restriction length polymorphism) (Ahmad et al., 2011) анализа разнообразия ключевых таксономических и функциональных групп почвенных микроорганизмов южной тайги.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На основе нуклеотидных последовательностей, полученных из международной базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), нами был создан массив из 886 358 последовательностей ДНК целевых групп организмов, обитающих в почве (характеристики массива приведены в табл. 1). Последовательности неудовлетворительного качества, включающие продолжительные участки с неопределенными основаниями, были исключены из последующего анализа.

Параллельно на основе литературных данных был создан массив из 83 праймеров, характеризующихся высокой специфичностью по отношению к исследуемым группам почвенных микроорганизмов. На их основе были подобраны 334 комбинации праймеров для амплификации определенных фрагментов генов и межгенных участков у изучаемых групп. Созданные комбинации впоследствии были опробованы *in silico* с помощью ПО BEsTRF v.3.6 (Stres et al., 2009) и ПО R v.3.0 (R Development Core Team, 2014) на массиве, включавшем последовательности ДНК целевых групп.

С использованием разработанной методики нами было проанализировано разнообразие упомянутых групп почвенных микроорганизмов в подзоне южной тайги в окрестностях Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ, Свердловская область, г. Ревда). Экстракция ДНК микроорганизмов выполнена из 0.25 г подстилки с помощью набора Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research). Поскольку экстрагированные из почвы нуклеиновые кислоты представляют собой смесь геномных ДНК различных микроорганизмов, то для уменьшения неспецифических репликации ДНК и связывания праймеров мы использовали полимеразу горячего старта (HotStarTaq Plus DNA Polymerase, Qiagen) в связке со ступенчатой ПЦР (touchdown PCR). После рестрикции продуктов ПЦР анализ полученных фрагментов ДНК был выполнен на автоматическом генетическом анализаторе ABI-3130 (Applied Biosystems).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам апробации, проведенной *in silico* на основе массива, включавшего комбинаций праймеров, характеризующихся

ТАБЛИЦА 1. Объем материала, полученного из базы генетических данных GenBank

Участок ДНК	Группа организмов	Количество последовательностей ДНК
<i>Таксономические группы:</i>		
Рибосомная ДНК ( <i>SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU</i> )	Все грибы	507 956
	Аскомицеты	201 605
	Базидиомицеты	109 318
	Гломеромицеты	25 611
$\beta$ -тубулин	Все грибы	17 228
<i>Функциональные группы:</i>		
Ксиланаза	Археи, бактерии, грибы	3 467
Лакказа	Базидиомицеты	5 271
$\beta$ -глюкозидаза	Дикариомицеты	3 265
Пероксидаза	Базидиомицеты	533
Целлобиогидролаза	Грибы	12 104
Итого		886 358

высокой специфичностью по отношению к исследуемым группам почвенных микроорганизмов, было выявлено, что некоторые праймеры, получившие широкое распространение, обладают существенными недостатками: имеют низкое покрытие целевой группы организмов (т.е. не охватывают все ее разнообразие), амплифицируют нецелевые группы (например, помимо грибов способны реплицировать ДНК растений) или проявляют разное сродство к дочерним подгруппам (например, праймер, нацеленный на дикариомицетов, охватывает преимущественно аскомицетов, в то время как разнообразие базидиомицетов может быть недоучтено). В связи с этим при поиске лучших комбинаций предпочтение отдавалось тем парам праймеров, которые проявляют наибольшую эффективность и селективность к анализируемой группе организмов. Наиболее перспективные комбинации праймеров, полученные в итоге анализа, приведены в табл. 2.

ТАБЛИЦА 2. Комбинации праймеров, подобранные для амплификации участков ДНК у изучаемых групп почвенных микроорганизмов

Участок ДНК	Группа организмов	Комбинация праймеров	Литературный источник	N	N <sub>u</sub>	L
Гены и спейсеры рибосомной РНК (SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU)	Все грибы	ITS1-F_KYO1 – ITS4	White et al., 1990; Nikolicheva, Bärlocher, 2004; Toju et al., 2012	16350	592	640.6 ± 93.4
	Аскомицеты	ITS1-F_KYO1 – ITS4Asco		2653	308	650.3 ± 117.4
	Базидиомицеты	ITS1-F_KYO1 – ITS4Basidio		1236	207	765.6 ± 66
	Зигмицеты	ITS1-F_KYO1 – ITS4Zygo		1415	161	695.7 ± 170.5
β-губулин	Все грибы	B36F – B12R	Thon, Roysce, 1999	2218	100	393 ± 78.4
рРНК (SSU)	Гломеромицеты	AML1 – AML2	Lee et al., 2008	2962	32	799.1 ± 3.5
Целлобиогидролаза	Дикариомицеты	cbhIF – cbhIR	Edwards et al., 2008	561	66	537.2 ± 40.9
β-глюкозидаза	Аскомицеты	Glc1_155F – Glc1_235R	Kellner et al., 2010	210	24	241.6 ± 24.5
β-глюкозидаза	Базидиомицеты	Glc2_250F – Glc2_390R	Kellner et al., 2010	198	24	474.8 ± 36.2
Лакказы	Базидиомицеты	Cu1F – Cu2R	Luis et al., 2004	2505	90	172.5 ± 35.5
Лакказы	Аскомицеты	Cu1AF – Cu2R	Luis et al., 2004	158	16	162.3 ± 28.4
Пероксидазы (класс II)	Базидиомицеты	PerF – PerR	Bödeker et al., 2009	216	75	517.6 ± 340.8
Ксиланаза	Грибы и бактерии	X10-F – X10-R	Wang et al., 2010	38	10	715 ± 1579.5
Ксиланаза	Грибы и бактерии	X11-F – X11-R	Wang et al., 2010	59	8	522 ± 1288.1

Примечание. N — количество совпадений в базе данных GenBank; N<sub>u</sub> — количество ампликонов, различающихся по длине; L — длина ампликона, пн (среднее значение ± стандартное отклонение).

Для целевых ампликонов, описанных в табл. 2, характеризующих каждую из исследуемых нами групп организмов, также *in silico* были подобраны эндонуклеазы рестрикции, максимизирующие разрешающую способность используемого метода, т.е. обеспечивающие максимальное количество флуоресцентно меченых концевых фрагментов ДНК, которые представляют собой различимые операционные единицы (OTU) целевой группы. Количество кандидатных рестриктаз составило 153. Анализ был выполнен в двух вариантах: с учетом места присоединения флуоресцентной метки к прямому (1) и обратному (2) праймеру (табл. 3).

На завершающем этапе подбора комбинаций «пара праймеров – положение флуоресцентной метки – рестриктаза» лучшие комбинации были выбраны таким образом, чтобы они максимально

ТАБЛИЦА 3. Результаты подбора эндонуклеаз рестрикции, максимизирующих количество уникальных концевых фрагментов ДНК исследуемых групп

Комбинация праймеров	Метка*	Рестриктаза	Количество уникальных концевых фрагментов и их размер, пн			
			<i>n</i>	Среднее±SD	<i>min</i>	<i>max</i>
ITS1-F_KYO1 – ITS4	F	ErhI	787	502.7±175.7	31	1560
ITS1-F_KYO1 – ITS4Asco	R	ErhI	391	536.7±192.3	80	1182
ITS1-F_KYO1 – ITS4Basidio	R	ErhI	320	599.7±194.8	36	995
ITS1-F_KYO1 – ITS4Zygo	R	ErhI	224	639.9±173.6	28	3814
B36F – B12R	F	Hinfl	87	313.3±146.6	1	628
AML1 – AML2	F	Hinfl	82	319.1±209.8	23	800
cbhIF – cbhIR	F	HaeIII	116	293.6±136.1	17	641
Glc1_155F – Glc1_235R	F	TaqI	49	173.2±72.8	3	309
Glc2_250F – Glc2_390R	F	AspLEI	73	291.1±138.8	28	566
Cu1F – Cu2R	F	TaqI	154	145.2±51.3	17	384
Cu1AF – Cu2R	F	TaqI	26	138.7±46.6	4	287
PerF – PerR	F	Hinfl	99	291.6±149.9	1	657
X10-F – X10-R	R	HaeIII	9	72.9±91	2	259
X11-F – X11-R	R	HaeIII	13	111.5±93.2	2	213

Примечание: \* – присоединение флуоресцентной метки к 5'-концу прямого праймера (F) или 3'-концу обратного (R).

удовлетворяли следующим условиям: 1) выявляли на электрофореграмме большое количество уникальных концевых фрагментов; 2) первый квартиль распределения размера концевых фрагментов был не менее 35 пар нуклеотидов; 3) средний размер фрагмента не превышал 800 пар нуклеотидов; 4) распределение фрагментов по размеру было относительно однородным во всем диапазоне. Изначально ожидалось, что наилучшие результаты будут достигнуты с одновременным использованием нескольких (2–3) рестриктаз. Однако в большинстве случаев увеличение количества рестриктаз служило причиной уменьшения числа выявляемых фрагментов (рис. 1), которые к тому же были очень плотно распределены на теоретически ожидаемых профилях (рис. 2), что должно затруднять дифференциацию филотипов.

Далее подобранные *in silico* комбинации «пара праймеров — положение флуоресцентной метки — рестриктаза» были использованы нами на образцах почвы из окрестностей СУМЗ. Так, например,

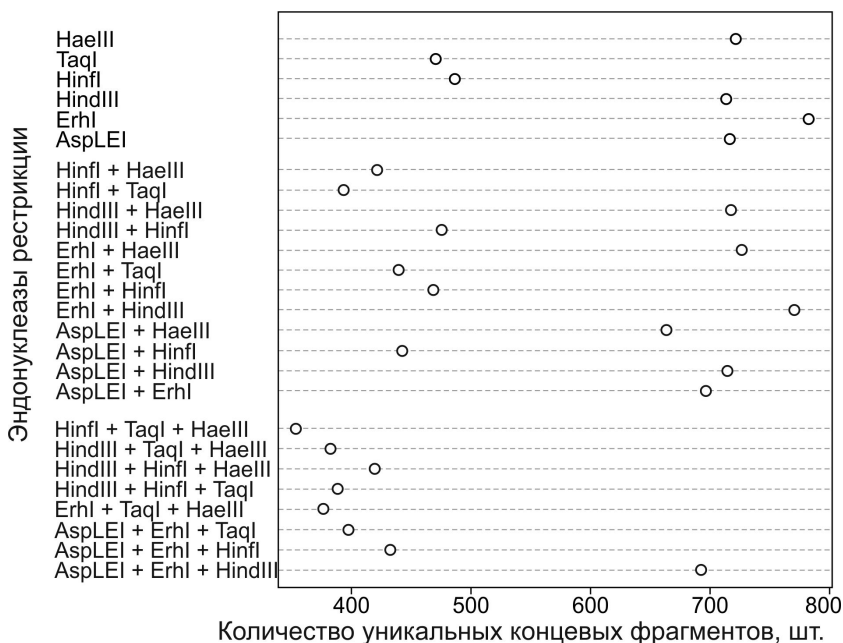


Рис. 1. Ожидаемое количество уникальных концевых фрагментов ДНК для группы почвенных грибов с использованием праймеров ITS1-F\_KYO1 — ITS4 и различных рестриктаз или их комбинаций (показана лишь часть комбинаций). Флуоресцентно меченый праймер — ITS1-F\_KYO1.

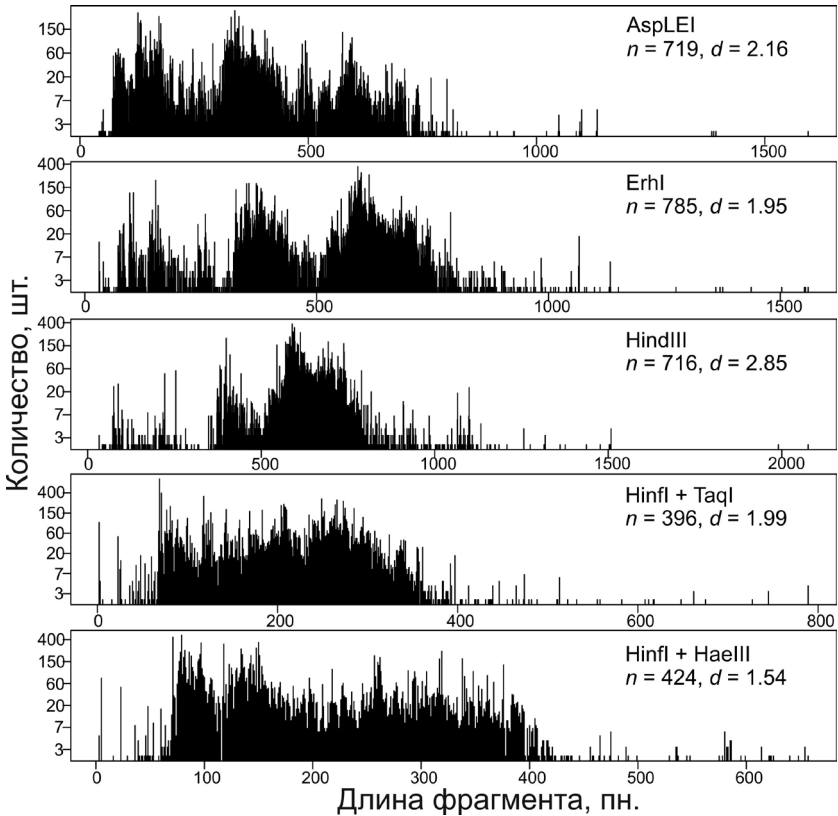


Рис. 2. Пример теоретически ожидаемых профилей концевых фрагментов ДНК для группы почвенных грибов с использованием праймеров ITS1-F\_KYO1 — ITS4 и различных рестриктаз. Флуоресцентно меченый праймер — ITS1-F\_KYO1;  $n$  — наблюдаемое количество уникальных концевых фрагментов ДНК;  $d$  — плотность профиля (количество уникальных фрагментов на единицу размаха длин фрагментов для анализируемой комбинации).

по результатам анализа разнообразия почвенных грибов (праймеры ITS1-F\_KYO1 — ITS4) в 36 пробах было обнаружено 382 филопита (рис. 3), а грибов арбускулярной микоризы (отдел Glomeromycota, праймеры AML1 — AML2) — 223 филопита. Неперспективными для использования оказались праймеры, нацеленные на  $\beta$ -глюкозидазу аско- и базидиомицетов (Glc1 и Glc2; Kellner et al., 2010), которые были крайне неспецифичны, а также на лакказу аскомицетов (Kellner et al., 2007), поскольку проявляли неспецифичность в отношении базидиомицетов.

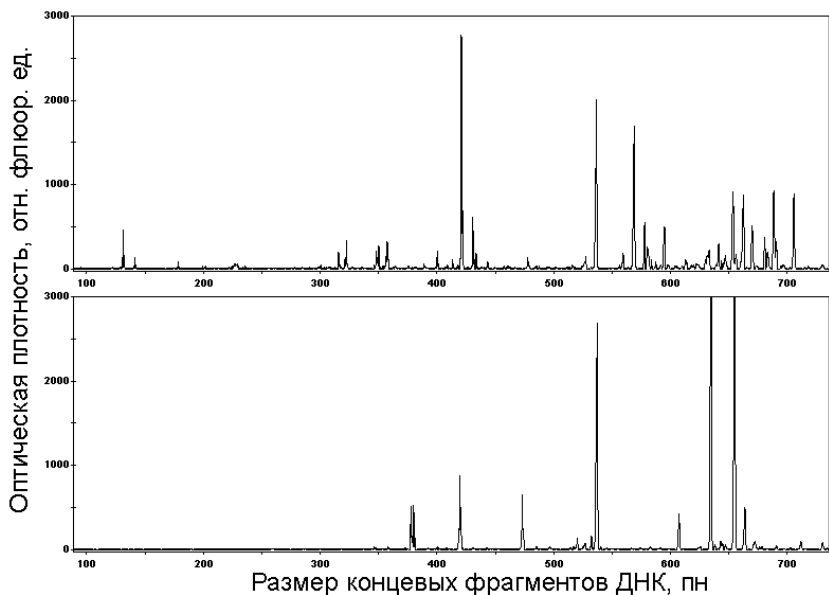


Рис. 3. Примеры электрофореграмм фрагментов рибосомной ДНК почвенных грибов (праймеры ITS1-F\_KYO1 — ITS4). Сверху показан образец подстилки из незагрязненной территории, снизу — из загрязненной. Каждый из пиков представляет собой отдельный филотип грибов, а его высота или площадь — относительное обилие в пробе.

Автор признателен Е.Л. Воробейчику и О.В. Дуле (ИЭРиЖ УрО РАН) за обсуждение работы и комментарии, И.Ю. Шпортко (УрФУ) — за техническую помощь в лабораторной работе. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-01699), Программы развития ведущих научных школ (НШ-2840.2014.4) и Программы Президиума УрО РАН «Живая природа» (проект № 12-П-4-1026).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahmad I., Ahmed F., Pichtel J. Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications. New York: Springer, 2011. 516 p.
- Bardgett R.D., Freeman C., Ostle N.J. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks // *Isme Journal*. 2008. V. 2. № 8. P. 805–814.
- Bödeker I.T.M., Nygren C.M.R., Taylor A.F.S. et al. Class II peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi // *Isme Journal*. 2009. V. 3. № 12. P. 1387–1395.
- Edwards I.P., Upchurch R.A., Zak D.R. Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. V. 74. № 11. P. 3481–3489.



- Kellner H., Zak D.R., Vandenbol M.* Fungi Unearthed: Transcripts Encoding Lignocellulolytic and Chitinolytic Enzymes in Forest Soil // *Plos One*. 2010. V. 5. № 6.
- Lee J., Lee S., Young J.P.W.* Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi // *Fems Microbiology Ecology*. 2008. V. 65. № 2. P. 339–349.
- Luis P., Walther G., Kellner H.* et al. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil // *Soil Biology & Biochemistry*. 2004. V. 36. № 7. P. 1025–1036.
- Nikolcheva L.G., Bärlocher F.* Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream // *Mycol Prog*. 2004. V. 3. № 1. P. 41–49.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Foundation for Statistical Computing. 2014. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Schloss P.D., Westcott S.L.* Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. V. 77. № 10. P. 3219–3226.
- Stres B., Tiedje J.M., Murovec B.* BESTRF: a tool for optimal resolution of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis based on user-defined primer-enzyme-sequence databases // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 12. P. 1556–1558.
- Thon M.R., Royle D.J.* Partial beta-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina // *Mycologia*. 1999. V. 91. № 3. P. 468–474.
- Toju H., Tanabe A.S., Yamamoto S., Sato H.* High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples // *Plos One*. 2012. V. 7. № 7.
- Wang G.Z., Wang Y.R., Yang P.L.* et al. Molecular detection and diversity of xylanase genes in alpine tundra soil // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. V. 87. № 4. P. 1383–1393.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Eds Innis M.A., Gelfond D.H., Sninsky J.J., White T.J. San Diego, 1990. P. 315–322.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

# **ЭКОЛОГИЯ: популяция, вид, среда**

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ  
КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

14 – 18 апреля 2014 г.  
ЕКАТЕРИНБУРГ

УДК 574 (061.3)

Э 40

*Материалы конференции изданы при финансовой поддержке  
Президиума Уральского отделения РАН (проект № 14-4-МШ-32)  
и Российского фонда фундаментальных исследований  
(проект № 14-04-06811).*

**Экология:** популяция, вид, среда. Материалы конф. молодых ученых, 14 – 18 апреля 2014 г. / ИЭРиЖ УрО РАН – Екатеринбург: Гощицкий, 2014. – 176 с.

В сборнике опубликованы материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: популяция, вид, среда». Мероприятие проходило в Институте экологии растений и животных УрО РАН с 14 по 18 апреля 2014 г. Работы посвящены проблемам изучения биологического разнообразия на популяционном, видовом и экосистемном уровнях, анализу экологических закономерностей эволюции, поиску механизмов адаптации биологических систем к экстремальным условиям, а также популяционным аспектам экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.

ISBN 978-5-98829-047-6

© Авторы, 2014

© ИЭРиЖ УрО РАН, 2014

© Оформление. Издательство «Гощицкий», 2014