

на правах рукописи

Слободова
Наталья Валерьевна

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ ПРОКАРИОТ
КИСЛЫХ ТОРФЯНЫХ ПОЧВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *nifH*

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2006

Работа выполнена в Центре «Биоинженерия» РАН.

Научный руководитель: кандидат биологических наук, ст.н.с.
Е.С. Булыгина

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
В.М. Горленко

кандидат биологических наук
И.А. Берг

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт фитопатологии (ВНИИФ) РАСХН

Защита состоится 24 октября 2006 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета
Д.501.001.21 в ауд. М-1 Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Адрес диссертационного совета: 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, стр. 1, корп. 12,
МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан 24 сентября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Н.Ф. Пискункова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Микробные сообщества являются важнейшими компонентами различных экосистем и играют решающую роль в метаболизме органической материи и в биогеохимической трансформации элементов, включая процесс фиксации атмосферного азота. Азотфиксация – главное звено в цикле азота, так как именно этот процесс лимитирует все остальные этапы превращения азота в биогеохимическом цикле. Способность к биологическому связыванию атмосферного азота присуща только представителям мира прокариот. Азотфиксирующие микроорганизмы присутствуют практически во всех экосистемах и способствуют их обогащению связанными формами азота. При этом распределение таких прокариот по различным экоценозам неоднородно и до сих пор еще мало изучено.

Одной из преобладающих наземных экосистем в бореальной зоне Евразии и Северной Америки являются кислые торфяные болота. Они занимают свыше 3% общей земной поверхности, а в России болота и заболоченные бореальные почвы распространены более чем на 20% территории (Dedysh et al., 2006). При этом данные экосистемы играют значительную биосферную и средообразующую роль, являясь, в частности, резервуарами связанных форм углерода и азота. Хотя в последние десятилетия интерес исследователей к проблеме фиксации азота в болотных экосистемах возрос, микробиология этого процесса еще очень мало изучена. Известно только, что азотфиксирующие микроорганизмы в торфяных почвах содержатся в значительном количестве, а исследований, посвященных определению биоразнообразия diaзотрофов в болотных почвах и выявлению их азотфиксирующего потенциала, до настоящего времени не проводилось.

Для анализа природных микробных популяций в последнее время широко применяют методы молекулярной экологии. При этом выявление микроорганизмов, выполняющих определенную функциональную роль в экосистеме, проводят с помощью детектирования генов-маркеров. Метод, основанный на сравнительном анализе последовательностей генов *nifH*, стал наиболее популярным для исследования биоразнообразия азотфиксирующих сообществ. Ген *nifH* кодирует один из компонентов нитрогеназы, являющейся ключевым ферментом азотфиксации. Этот подход, в отличие от метода, основанного на анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, позволяет достаточно полно определить видовой состав сообщества, обладающего

азотфиксирующим потенциалом. Использование гена *nifH* для анализа диазотрофных микробных сообществ имеет ряд преимуществ, основным из которых является достаточно большая база данных, содержащая уже более 9000 последовательностей.

Таким образом, изучение биоразнообразия азотфиксирующих прокариот в различных природных экосистемах относится к важнейшим задачам микробной экологии. При этом именно современные молекулярно-биологические подходы, обладающие высокой разрешающей способностью, позволяют проводить наиболее полный анализ разнообразия микроорганизмов в природных сообществах.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось проведение анализа биоразнообразия азотфиксирующих прокариот микробных консорциумов болотных почв с помощью методов молекулярной экологии.

Задачи исследования состояли в следующем:

1. Разработка эффективного и быстрого метода выделения пригодной для ПЦР-анализа тотальной ДНК из различных почвенных сообществ.
2. Определение первичных последовательностей генов *nifH* фототрофных микроорганизмов, не представленных в базе данных.
3. Сравнение эффективности анализа последовательностей генов *nifH* и других методов для изучения биоразнообразия микробных сообществ.
4. Применение анализа последовательностей генов *nifH* для изучения состава азотфиксирующего сообщества торфяной болотной почвы.

Научная новизна работы. Разработан универсальный экспресс-метод выделения ПЦР-пригодной ДНК, позволяющий получать препараты из почв, существенно различающихся по своим физико-химическим характеристикам, в том числе с низкими значениями рН и богатых органическими веществами.

Впервые проведено исследование разнообразия азотфиксирующих микроорганизмов кислой торфяной болотной почвы с помощью анализа генов *nifH*. Показано наличие микроорганизмов, относящихся к α -, γ - и δ -Протеобактериям, группе аноксигенных нитчатых фототрофных бактерий (АНФБ), зеленых серных бактерий. Впервые в кислых торфяных почвах выявлены микроорганизмы, близкие к родам *Azospirillum* и *Oscillochloris*, что расширяет список мест их обитания.

По результатам работы в базу GenBank депонированы 25 последовательностей генов *nifH*, принадлежащих различным микроорганизмам, и проведен их сравнительный анализ. Показано, что некоторые последовательности генов *nifH* неидентифицированных микроорганизмов, представленные в базе данных GenBank, относятся к фотосинтезирующим бактериям.

Практическая значимость работы. Разработанный метод в силу своей универсальности может применяться при проведении сравнительного анализа биоразнообразия микроорганизмов, обитающих в различных типах почв.

Расширение базы данных последовательностей генов *nifH* позволит создавать более специфичные зонды для выявления и мониторинга конкретных групп микроорганизмов, их количественной оценки. Депонированные последовательности описанных микроорганизмов позволят проводить более точный анализ состава микробных сообществ.

Полученные результаты расширяют представление о таксономическом разнообразии азотфиксирующих бактерий в кислых торфяных почвах.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на 9 Международном симпозиуме по азотфиксации (Левен, Бельгия, 2002), 8 Международном симпозиуме по биогеохимии болотных почв (Гент, Бельгия, 2003), представлены на 6 Европейской конференции по азотфиксации (Тулуза, Франция, 2004) и Международной конференции «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения» (Апатиты, Россия, 2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи и 5 тезисов в сборниках работ российских и зарубежных конференций.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста и включают 15 рисунков, 16 таблиц, 1 диаграмму. Диссертация состоит из разделов: “Введение”, “Обзор литературы”, “Экспериментальная часть” (включающая главы “Объекты и методы исследования”, “Результаты и обсуждение”), “Выводы” и “Список литературы”, который содержит 26 отечественных и 253 иностранных наименования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись: 25 штаммов различных микроорганизмов, 3 метанотрофные накопительные культуры (SB26, SB31, SB31A), а также образцы кислой торфяной почвы сфагнового болота п. Сосвятское (Тверская обл., Россия) любезно предоставленные сотрудниками лаборатории классификации и хранения уникальных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (ИНМИ) и кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ.

Выделение ДНК. Из биомассы микроорганизмов ДНК выделяли по модифицированному методу Бирнбойма-Доли (Birnboim and Doly, 1979) и Wizard-технологии фирмы Promega (США). Для получения препаратов ДНК из почвенных образцов использовали два различных подхода: (1) щелочной лизис клеток непосредственно в почвенных образцах, (2) лизис бактериальных клеток, очищенных от других почвенных компонентов.

ПЦР-амплификация. Получение ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК проводили с использованием универсальных праймеров: 11F, 519R, 1492R (Lane, 1991). Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: буфер ДНК полимеразы (67мМ Трис-НСl, рН 8,8; 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 2 мМ MgCl₂), по 6 нмоль каждого из dNTP, 20-50 нг ДНК-матрицы, по 6,25 пмоль прямого и обратного праймеров и 1,5 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия).

Для получения ПЦР-фрагментов генов *nifH* были использованы разработанные ранее в нашей лаборатории праймеры F1 и R6 (Марусина и др., 2001). Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: буфер ДНК полимеразы (67мМ Трис-НСl, рН 8,8; 17 мМ (NH₄)₂SO₄); 1,5 мМ MgCl₂, по 5 нмоль каждого из dNTP, по 6.25 пмоль прямого и обратного праймеров, 20-50 нг ДНК-матрицы, 1,25 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия).

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл), при напряженности поля 6 В/см², и документировали с помощью системы BioDoc Analyzer II (Biometra, Германия).

Очистка фрагментов ПЦР в агарозе. Продукты ПЦР очищали от посторонних примесей при помощи электрофореза в 0.8% легкоплавкой агарозе с применением набора PCR-Preps (Promega, США).

Клонирование ПЦР-фрагментов. Выделенные ПЦР-фрагменты клонировали в векторе pGEM-T (Promega, США). Продуктами лигирования трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамм DH5 α . Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили при помощи набора Wizard MiniPrep (Promega, США), согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-фрагментов. Секвенирование проводили по методу Сенгера (Sanger et.al., 1977). Плазмиды со вставкой секвенировали с универсальных плазмидных праймеров SP6 и T7. Для секвенирования ПЦР-фрагментов генов *nifH* использовали те же праймеры, что и при амплификации.

Для проведения секвенирования использовали набор “Silver Sequencing” (Promega, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя, с незначительными модификациями. Электрофорез проводили на приборе SQ3 Sequencer, (Hofer, США) в 7%-ном полиакриламидном геле толщиной 0,19 мм в денатурирующих условиях (в присутствии 7М мочевины). Последовательность нуклеотидов в ДНК считывали непосредственно с радиоавтографов гелей (Чемерис и др., 1999).

Анализ полученных последовательностей. Поиск близкородственных последовательностей в базе GenBank проводили с помощью программного пакета BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Транслирование нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Множественное выравнивание последовательностей - с помощью программы CLUSTAL W 1.75 (Thompson et al., 1994) (<http://www.genebee.msu.su/clustal>).

Построение дендрограмм осуществляли с помощью программы TREECON Windows (Van de Peer and Wachter, 1994). Генетические расстояния (D) при построении дендрограмм по данным анализа транслированных последовательностей фрагментов генов *nifH* рассчитывали по формуле Таджима-Нея (Tadjima and Nei, 1984):

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка экспресс-метода получения препаратов ДНК из почвенных образцов.

При использовании молекулярно-биологических методов выделение ДНК является первым и в большинстве случаев определяющим этапом, так как от качества и количества полученных препаратов ДНК во многом зависит результат всех дальнейших исследований. Выделение ДНК из почвы, в отличие от других природных сообществ, осложнено высоким содержанием органических веществ, в частности гуминовых кислот, которые ингибируют проведение ПЦР. При этом для сравнительного анализа состава почвенных микробных сообществ представляется логичным использовать единый метод выделения ДНК, который позволит получать препараты из различных типов почв.

Первой стадией выделения ДНК является лизис клеток, его можно проводить как непосредственно в почвенном образце, так и после получения фракции бактериальных клеток. Первоначально мы использовали метод прямой экстракции нуклеиновых кислот из почвенного образца. Однако при таком методе вместе с ДНК выделяется большое количество гуминовых кислот, и получение ПЦР-пригодных препаратов требует, как правило, дальнейшей длительной и многоступенчатой очистки. Так как нашей задачей было отработать быстрый и универсальный метод выделения ДНК, от такого подхода было решено отказаться, и выделение ДНК проводили через стадию получения бактериальных клеток. При этом для получения фракции бактериальных клеток из почвенных образцов использовали четыре буфера (рис. 1).

Первый буфер (ТЕ; 30 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA) наиболее часто применяют при выделении ДНК. Фосфатный буфер (№ 2) способствует десорбции клеток с почвенных частиц. Третий и четвертый буферы представляют собой буфер ТЕ с добавлением поливинилпирролидона (PVPP) и додецилсульфата натрия (SDS) или цетилтриметиламмония бромида (СТАВ), которые способствуют удалению гуминовых кислот.

Для выделения ДНК из клеток, отмытых на предыдущей стадии от загрязняющих веществ, был выбран метод щелочного лизиса с последующей очисткой препаратов на ионообменных смолах. Эффективность такой процедуры очистки подтверждена многолетней практикой работы лаборатории с широким кругом прокариот.

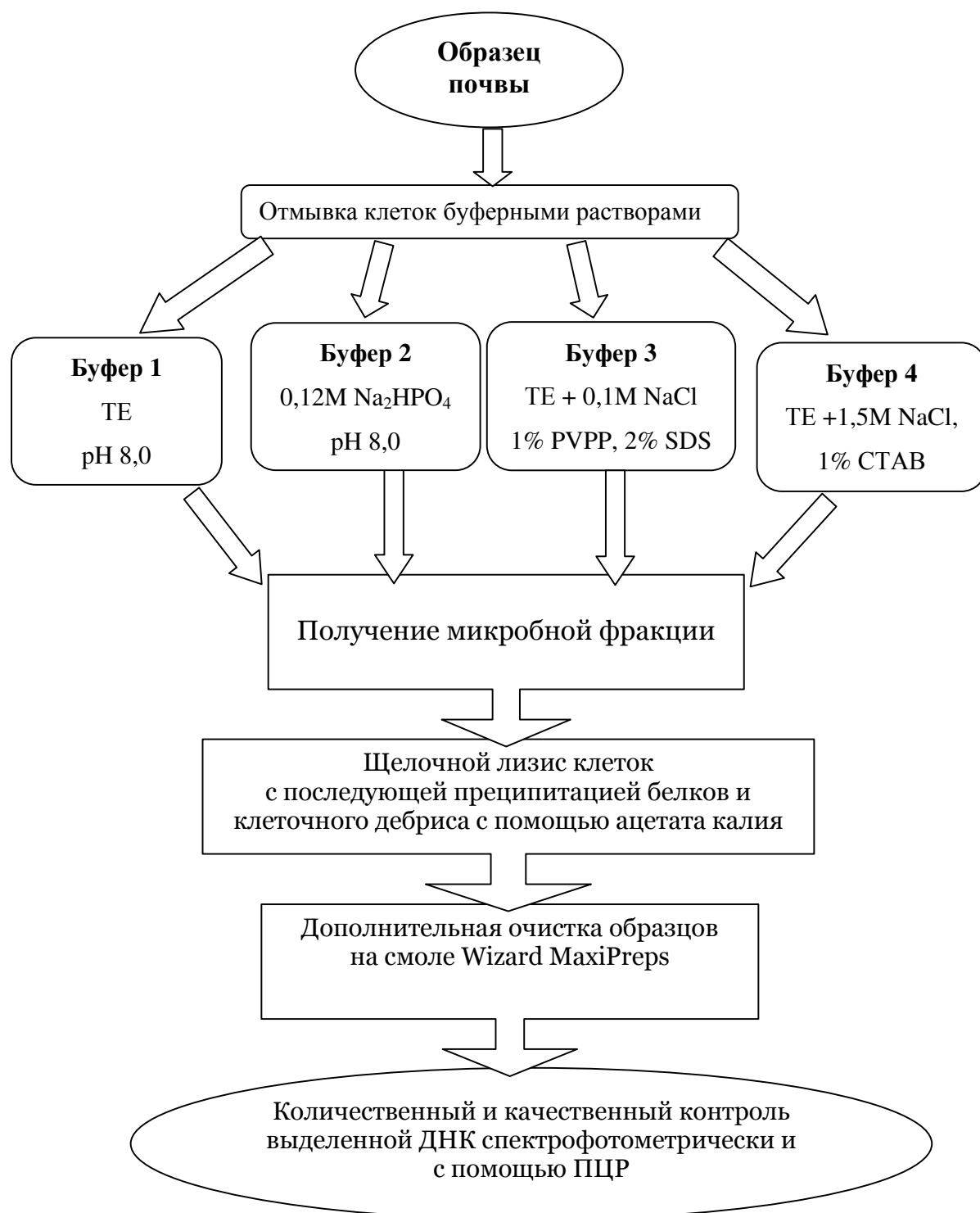


Рисунок 1. Схема получения препаратов ДНК через стадию выделения фракции бактериальных клеток с помощью четырех различных буферных растворов.

Метод относительно нетрудоемок, не требует больших временных затрат, а получаемые препараты ДНК пригодны для дальнейшего ПЦР-анализа.

Количественные и качественные характеристики препаратов ДНК, полученных с помощью различных буферных растворов из трех образцов почв, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики препаратов ДНК, выделенных из микробных сообществ различных типов почв с помощью четырех буферных растворов.

	Тундровая, торфяно-глеевая почва (Воркута, февраль 2004)			
	буфер 1	буфер 2	буфер 3	буфер 4
A_{260}/A_{280}	1,80±0,21	1,92±0,30	1,97±0,21	1,69±0,27
Кол-во ДНК на 1 г почвы, мкг	2,10±0,09	0,60±0,07	1,50±0,09	1,50±0,10
	Серая лесная, суглинистая почва смешанного леса (Московская обл., г. Пушкино, ноябрь 2003)			
	буфер 1	буфер 2	буфер 3	буфер 4
A_{260}/A_{280}	1,74±0,26	1,38±0,22	1,63±0,20	1,61±0,32
Кол-во ДНК на 1 г почвы, мкг	1,90±0,10	2,00±0,10	1,40±0,10	2,90±0,05
	Торфяная почва (Тверская обл., п. Сосвятское, октябрь 2003)			
	буфер 1	буфер 2	буфер 3	буфер 4
A_{260}/A_{280}	1,35±0,57	1,28±0,46	1,53±0,38	1,57±0,59
Кол-во ДНК на 1 г почвы, мкг	0,18±0,06	0,21±0,06	0,17±0,05	0,23±0,06

Все полученные препараты были проверены на пригодность к ПЦР-анализу и были использованы для получения как практически полной ПЦР-копии гена 16S рРНК (1481 п.н.), так и его фрагмента (508 п.н.) (рис. 2).

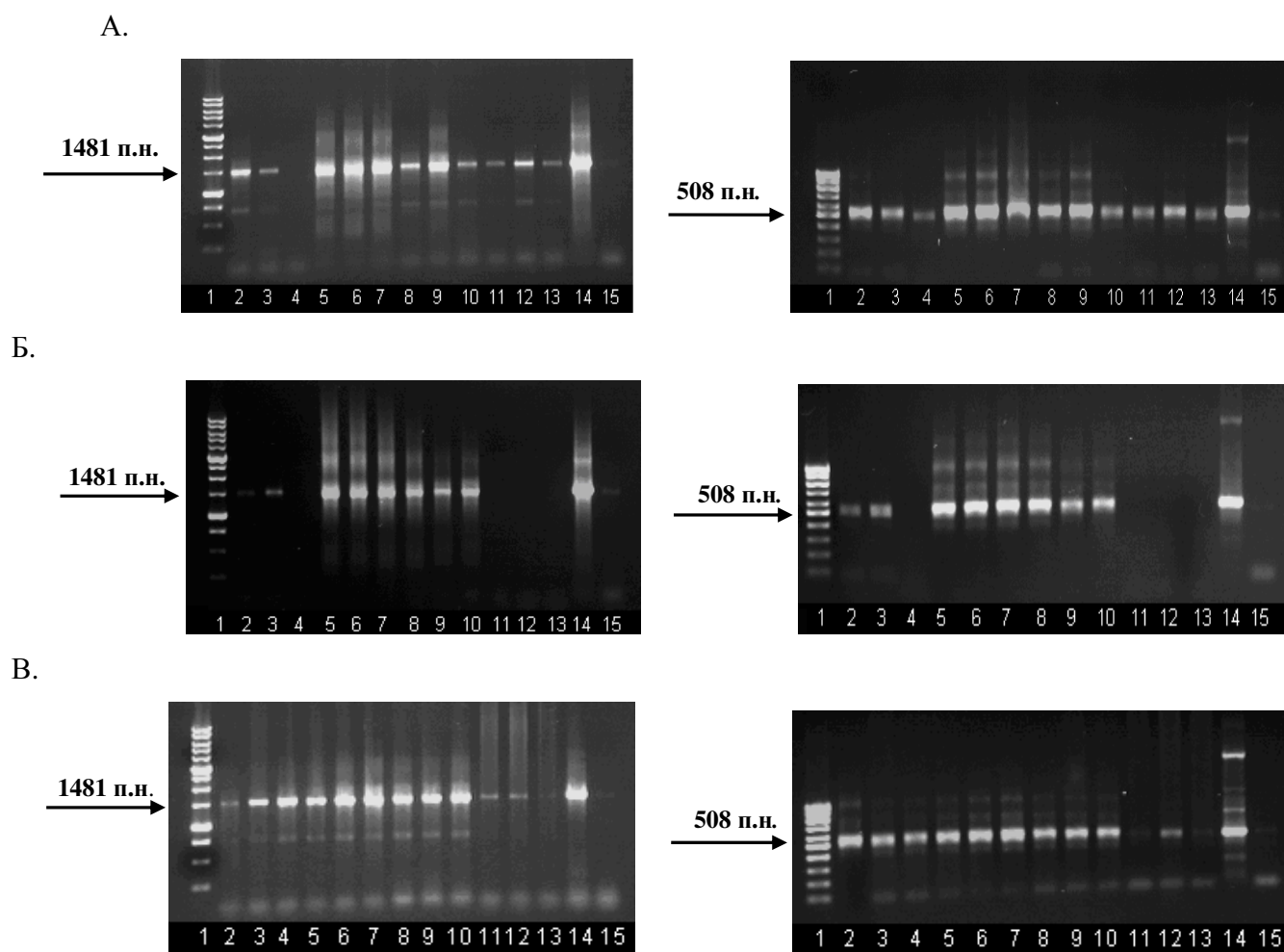
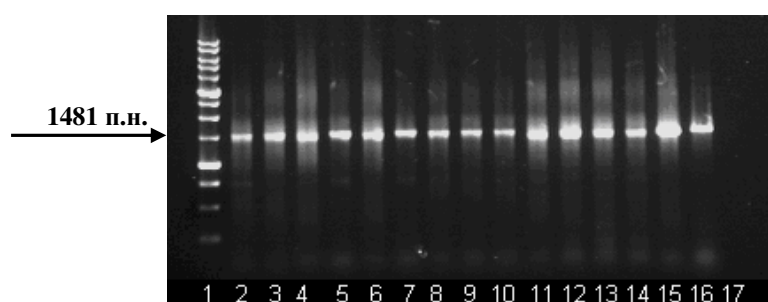


Рисунок 2. Амплификация фрагментов генов 16S рРНК на препаратах ДНК, выделенных различными методами из микробных бактериальных сообществ: А - торфяно-глеевой почвы (г. Воркута); Б - серой лесной почвы (г. Пущино, Московская обл.); В - торфяной почвы (п. Сосвятское, Тверская обл.). Стрелкой указан целевой фрагмент (слева – размер фрагмента 1481 п.н., справа – 508 п.н.). Цифрами обозначены: 1 –маркер молекулярной массы ДНК; 2,3,4 – ДНК, выделенная способом 1; 5,6,7 – ДНК, выделенная способом 2; 8,9,10 – ДНК, выделенная способом 3; 11,12,13 – ДНК, выделенная способом 4; 14 – ДНК *Escherichia coli* (положительный контроль); 15 – Контроль в отсутствии ДНК матрицы.

В результате сопоставления этих данных со степенью чистоты препаратов ДНК (соотношение A_{260}/A_{280} ; в чистых препаратах $>1,75$) и выходом ДНК из 1 г почвы для дальнейшей работы был выбран способ 3 как наиболее оптимальный. Он был дополнительно протестирован на образцах 7 типов почв, существенно отличающихся по своим физико-химическим характеристикам и полученным как из интактных природных

экосистем, так и из мест с повышенной антропогенной нагрузкой. Анализ результатов показал, что выбранным способом (№ 3) удастся получить препараты ДНК приемлемой чистоты (соотношение A_{260}/A_{280} варьировало от 1,47 до 1,97) для всех 10 проанализированных типов почв, включая торфяную и торфяно-глебовую почвы, выделение ДНК из которых осложнено низкими значениями величин рН (3.9 и 5.0, соответственно) и высоким содержанием органических веществ. В результате проведения амплификации было показано, что препараты ДНК, полученные с помощью буфера 3, пригодны для получения ПЦР-фрагментов как частичного, так и практически полного гена 16S рРНК (рис. 3).

А.



Б.

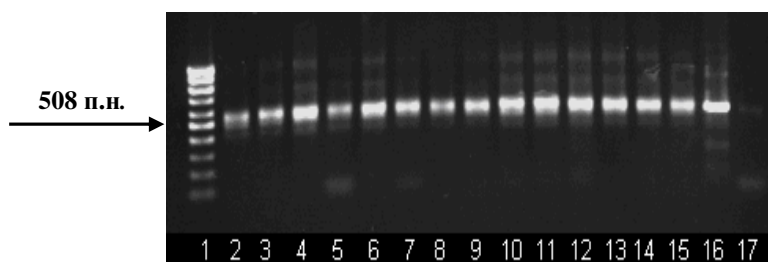


Рисунок 3. Амплификация фрагментов генов 16S рРНК на препаратах ДНК, выделенных способом 3 из бактериальных сообществ различных типов почв. Стрелкой указан целевой фрагмент. А – размер фрагмента 1481 п.н., Б – размер фрагмента 508 п.н.

Цифрами обозначены: 1–маркер молекулярной массы ДНК; 2, 3 – ДНК, выделенная из суглинистой пахотной почвы (Жирона, Испания); 4, 5 – ДНК, выделенная из суглинистой пахотной почвы (Гистель, Бельгия); 6, 7 – ДНК, выделенная из супесчаной пахотной почвы (Беллем, Бельгия); 8, 9 – ДНК, выделенная из супесчаной аллювиальной почвы (Стелленбош, ЮАР); 10 – ДНК, выделенная из суглинистой пахотной почвы (Пушино, Моск. обл.); 11 – ДНК, выделенная из суглинистой лесной почвы (Жирона, Испания); 12 – ДНК, выделенная из тундровой, торфяно-глебовой почвы (Воркута); 13 – ДНК, выделенная из торфяной почвы (п. Сосвятское, Тверская обл.); 14 – ДНК, выделенная из суглинистой лесной почвы (Пушино, Моск. обл.); 15 – ДНК, выделенная из суглинистой луговой почвы (Пушино, Моск. обл.); 16 – ДНК *Escherichia coli* (положительный контроль); 17 – Контроль в отсутствии ДНК матрицы.

2. Изучение последовательностей генов *nifH* у различных микроорганизмов.

В исследованиях различных природных diaзотрофных сообществ всегда обнаруживается большое количество неидентифицируемых прокариот. Это в значительной степени обусловлено ограниченностью базы данных для культивируемых микроорганизмов. Расширение базы данных последовательностей генов *nifH* для культивируемых азотфиксаторов способствует более полной идентификации микроорганизмов при исследовании природных сообществ. База данных последовательностей генов *nifH* для ряда групп аноксигенных фототрофных бактерий была невелика, тогда как эти прокариоты очень широко распространены в природе и имеют высокое экологическое значение. На начало нашего исследования фототрофные микроорганизмы, относящиеся к группе γ -Протеобактерий в базе данных GenBank были представлены единственной последовательностью фрагмента гена *nifH* *Marichromatium purpuratum*. Последовательности генов *nifH* группы АНФБ вообще отсутствовали, несмотря на то, что у представителей рода *Oscillochloris* была отмечена способность к азотфиксации (Кеппен, 1989). В данном исследовании были определены последовательности генов *nifH* 21 представителя фототрофных микроорганизмов, находящихся в коллекциях ИНМИ и кафедры микробиологии МГУ. Среди этих бактерий были представители 4 родов α -Протеобактерий (*Phaeospirillum*, *Rhodoblastus*, *Rhodoplanes*, *Rhodovulum*), 5 родов γ -Протеобактерий (*Allochromatium*, *Thiocapsa*, *Ectothiorhodospira*, *Thiorhodospira*, *Halorhodospira*), а также представитель β -Протеобактерий из рода *Rubrivivax*. Кроме того, впервые были получены последовательности генов *nifH* *Osc. trichoides* (штаммы КР, Р, Dg6) из группы АНФБ.

Сравнительный анализ полученных последовательностей показал, что некоторые ранее неидентифицированные клоны из природных сообществ, представленные в базе данных GenBank, относятся к фототрофным бактериям.

3. Сравнение молекулярных, серологических и микроскопических методов для характеристики микробных сообществ.

Очень часто исследования природных микробных сообществ проводят с использованием какого-либо одного молекулярного ДНК-маркера. Однако изучение сложных природных систем требует комплексного подхода, поэтому при исследовании состава модельного микробного сообщества мы использовали несколько методов:

микроскопический, иммунологический и молекулярный, с целью сравнения их эффективности.

В качестве модельного объекта исследования нами были выбраны 3 метанооксиляющие накопительные культуры (SB26, SB31, SB31A), выделенные из торфяной почвы верхового болота Сосвятское. Все культуры обладали растворимой метанмонооксигеназой (pММО) (нафталеновый тест). Культура SB31 обладала интенсивным розово-оранжевым пигментом, тогда как у культуры SB26 такая пигментация отсутствовала. Культура SB31A - производная культуры SB31, утратившая пигментацию. Преимуществом накопительной культуры для исследования такого рода является то, что в ней искусственно ограничено количество компонентов по сравнению с естественным природным сообществом. Это позволяет проводить более точный анализ состава сообщества. Данная работа была проведена совместно с коллегами из ИНМИ.

3.1. Микроскопический и серологический анализ. При проведении электронно-микроскопического анализа по признаку наличия хорошо развитых внутриклеточных мембран в одной накопительной культуре (SB26) было выявлено присутствие только метанотрофов II типа, а в двух других (SB31 и SB31A) – I и II типов. Таким образом, этот анализ позволил сделать предварительное заключение о составе исследуемых сообществ.

Для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) были использованы видоспецифичные сыворотки, и по результатам проведенного исследования (Слободова и др., 2006) удалось не только выявить присутствие метанотрофов I и II типов, но и провести их видовую диагностику (табл. 2). Так, в культуре SB26 было установлено наличие метанотрофов только II типа: *Methylosinus trichosporium* и *Methylocystis echinoides*. В культурах SB31 и SB31A были обнаружены метанотрофы как I, так и II типа: *Ms. trichosporium*, *Methylococcus capsulatus* и *Methylomonas methanica* были выявлены в культуре SB31, а *Ms. trichosporium* и *Ms. capsulatus* - в культуре SB31A.

3.2. Молекулярный анализ. Молекулярный анализ проводили независимо по двум типам функциональных генов – *pmoA* и *nifH*. Метанмонооксигеназа (ММО) является ключевым ферментом окисления метана метанотрофами. В настоящее время выявлены две ферментные системы: растворимая (sММО) и мембраннcвязанная (pММО). pММО, в отличие от sММО, присутствует во всех известных метанотрофах, кроме *Methylocella* (Dedysh et al., 2000). Наиболее часто в экологических исследованиях используют анализ последовательностей гена *pmoA*, кодирующего 27 kDa субъединицу pММО (Holmes et al.,

1995), и в нашей работе мы также использовали этот ген для анализа. Результаты исследования генов *pmoA* в целом согласуются с данными, полученными методом ИФА. С помощью анализа генов *pmoA* представители рода *Methylocystis* были выявлены во всех накопительных культурах, а рода *Methylomonas* – только в SB31. Однако, в отличие от результатов ИФА, *Mcs. capsulatus* в культуре SB31А обнаружен не был.

Присутствие генов нитрогеназного комплекса, в том числе гена *nifH*, было показано для представителей метанотрофов I и II типов, что позволило нам использовать этот ген в качестве молекулярного маркера (Булыгина и др., 2002). На момент исследования в базе данных GenBank последовательности генов *nifH* для представителей родов *Methylocella* и *Methylocapsa* отсутствовали. Нами были определены последовательности фрагментов генов *nifH* у *Methylocella palustris* K2a и *Methylocapsa acidiphila* B2, что позволило выявить присутствие *Methylocella palustris* в накопительных культурах и провести, соответственно, более точный анализ состава сообщества.

Суммарно для трех накопительных культур было получено 176 клонов, содержащих вставку фрагментов генов *nifH*. Результаты анализа генов *nifH* в целом согласуются с данными, полученными серологическим методом и исследованием генов *pmoA*. Анализ полученных клонов показал, что часть из них оказалась наиболее близкой к метанотрофам II типа из рода *Methylocystis* (98-99% сходства транслированных аминокислотных последовательностей). В накопительной культуре SB26 клон 26-4п проявил наибольшее сходство с *Mcs. echinoides* (99% сходства транслированных аминокислотных последовательностей), а клоны 26-3п и 26-5п – с *Mcs. minimus* (98 и 99% сходства, соответственно). На дендрограмме, построенной на основе транслированных последовательностей генов *nifH*, все эти клоны образовали компактный кластер с *Mcs. minimus* и *Mcs. echinoides* (рис. 4). В накопительной культуре SB31 клоны 31-5п и 31А-1п обнаружили наибольшее сходство с *Methylocella palustris* (100 и 97% сходства транслированных аминокислотных последовательностей, соответственно). На дендрограмме эти клоны образовали общий кластер с *Methylocella palustris*, а клон 31-3п группировался с *Azospirillum brasilensis* (97% сходства транслированных аминокислотных последовательностей) и *Rhizobium phaseoli* (95% сходства).



Рисунок 4. Дендрограмма, построенная на основе анализа транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов генов *nifH*.

Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 10 заменам на 100 аминокислотных остатков (эволюционным расстоянием). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 500 альтернативных деревьев.

В целом результаты, полученные четырьмя методами, дополняют друг друга (табл. 2). Некоторые различия могут быть объяснены несколькими причинами. Во-первых, согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), доля метанотрофов I типа в накопительных культурах была довольно низкой.

Эти результаты согласуются с анализом библиотеки клонов гена *pmoA*, в которой последовательности, близкие к *Methylomonas*, составляли менее 4%. Возможно, именно низкая численность метанотрофов I типа явилась причиной того, что нам не удалось обнаружить бактерии рода *Methylomonas* с помощью анализа генов *nifH* и *Methylococcus* с помощью анализа генов *nifH* и *pmoA*. Кроме того, высокая степень вырожденности использованных праймеров и разница в эффективности работы праймерной системы на различных матрицах ДНК также могут исказить конечные результаты. И, наконец, хотя перекрестные реакции и видовая специфичность антител были проверены и подтверждены на чистых коллекционных культурах, иммунные характеристики метанотрофов в природных объектах могут отличаться.

Таблица 2. Сравнение результатов анализа состава накопительных культур, полученных с помощью различных методов.

Культура	ТЭМ	ИФА	Анализ генов <i>pmoA</i>	Анализ генов <i>nifH</i>
SB26	Метанотрофы II типа	<i>Methylosinus trichosporium</i> ; <i>Methylocystis echinoides</i>	<i>Methylocystis echinoides</i>	<i>Methylocystis echinoides</i> , <i>Methylocystis minimus</i> ; <i>Methylocystis spp.</i>
SB31	Метанотрофы I и II типов	<i>Methylosinus trichosporium</i> ; <i>Methylococcus capsulatus</i> ; <i>Methylomonas methanica</i>	<i>Methylocystis echinoides</i> ; <i>Methylomonas methanica</i>	<i>Methylocystis echinoides</i> , <i>Methylocystis minimus</i> ; <i>Methylocella palustris</i>
SB31A	Метанотрофы I и II типов	<i>Methylosinus trichosporium</i> ; <i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylocystis echinoides</i>	<i>Methylocystis echinoides</i> , <i>Methylocystis minimus</i> ; <i>Methylocella palustris</i>

Таким образом, ТЭМ позволяет выявлять особенности ультратонкой структуры клеток и может давать на этой основе предварительную количественную оценку исследуемого сообщества, однако не позволяет проводить идентификацию

микроорганизмов даже на уровне семейства. ИФА дает важную информацию о составе сообщества, но его применение ограничивается наличием соответствующих сывороток. Молекулярные методы, хотя и обладают высокой разрешающей способностью, но также зависят от целого ряда факторов, влияющих на конечный результат. Критическими являются: эффективность выбранного метода выделения ДНК, результативность работы праймерной системы, наличие гена-мишени у исследуемых микроорганизмов (в нашем случае отсутствие *pmoA* у *Methylocella* не позволило обнаружить данную бактерию в исследованных накопительных культурах). Ограниченность базы данных также часто не позволяет проводить идентификацию микроорганизмов, о чем свидетельствует большое число последовательностей генов «некультивируемых» или неидентифицированных микроорганизмов. Следовательно, только параллельное использование нескольких экспериментальных подходов позволяет получить наиболее полные данные о составе исследуемого сообщества.

4. Анализ diaзотрофного сообщества кислой торфяной почвы сфагнового верхового болота.

До сих пор практически отсутствуют работы, посвященные определению биоразнообразия diaзотрофов в кислых болотных почвах и выявлению их азотфиксирующего потенциала. Нами было изучено разнообразие азотфиксаторов в образцах кислой торфяной почвы сфагнового верхового болота (п. Сосвятское, Тверская область) с помощью анализа последовательностей гена *nifH* и проведено сравнение наших результатов с данными ИФА, полученными коллегами из ИНМИ. Для молекулярного анализа состава diaзотрофного сообщества суммарная ДНК была выделена из образцов торфа, взятых с глубины 10-20 см, на которой была показана наибольшая азотфиксирующая активность (Кравченко и Дорошенко, 2003). С использованием универсальных праймеров F1 и R6 было получено и проанализировано 136 клонов, содержащих вставку генов *nifH*. Эти клоны были разделены на 25 различных групп (сиквенс-типов) и был проведен поиск близкородственных последовательностей в базе данных GenBank. В результате этого анализа мы смогли определить таксономическую принадлежность ряда выявленных последовательностей на уровне рода.

Так, транслированные аминокислотные последовательности генов *nifH* diaзотрофов сиквенс-типа SB-1 были наиболее близкими с аналогичной последовательностью гена *nifH*

ацидофильной метанотрофной бактерии *Methylocella palustris* (98% уровень гомологии). На дендрограмме представители этого сиквенс-типа образовали общий кластер с данным микроорганизмом. Сиквенс-тип SB-2 был близким к представителям рода *Azospirillum* (уровень гомологии транслированных аминокислотных последовательностей - 95%). Для кислых торфяных почв этот факт был отмечен впервые и послужил основой для выделения в чистую культуру и описания нашими коллегами из ИНМИ (Дорошенко и др., 2006) новых штаммов *Azospirillum lipoferum*. Сиквенс-типы SB-3, SB-4, SB-5 оказались довольно близки между собой (уровень гомологии транслированных аминокислотных последовательностей - 92-97%). На дендрограмме (рис. 5) они образовали отдельный кластер внутри группы α -Протеобактерий. Сиквенс-тип SB-6 оказался наиболее близким к представителям рода *Methylocystis* из группы метанотрофных бактерий II типа (93% гомологии транслированных аминокислотных последовательностей). Транслированные аминокислотные последовательности генов *nifH* сиквенс-типа SB-7 были близки к аналогичным последовательностям генов *nifH* представителей рода *Bradyrhizobium* (99% гомологии). На дендрограмме эта группа клонов и представители данного рода образовали общий кластер.

Сиквенс-типы SB-8 — SB-13 образовали отдельный кластер внутри группы γ -Протеобактерий, наиболее близкий к представителям метанотрофов I типа из рода *Methylobacter*. Однако, достаточно низкий уровень гомологии (83-88%) между транслированными аминокислотными последовательностями клонов и аналогичными последовательностями представителей различных родов из γ -Протеобактерий не позволяет их точно идентифицировать. Вероятно, в исследуемом микробном сообществе кислой торфяной почвы сфагнового верхового болота присутствует несколько различных видов до сих пор не описанных бактерий. Возможно также, что часть этих клонов относится к известным видам, последовательности генов *nifH* которых пока не представлены в базе данных. Ранее с помощью ИФА, (И.К. Кравченко, устное сообщение), в данном микробном сообществе было показано присутствие метанотрофных бактерий I типа в незначительном количестве (4-5% от общего количества прокариот). Как и в случае минорных компонентов в накопительных культурах, мы также не смогли выявить этих бактерий, тем более что, по мнению ряда исследователей, предел чувствительности молекулярных подходов составляет около 5% (Vodrossy et al., 2003). Это еще раз подтверждает необходимость параллельного использования нескольких методов для исследования микробных популяций.

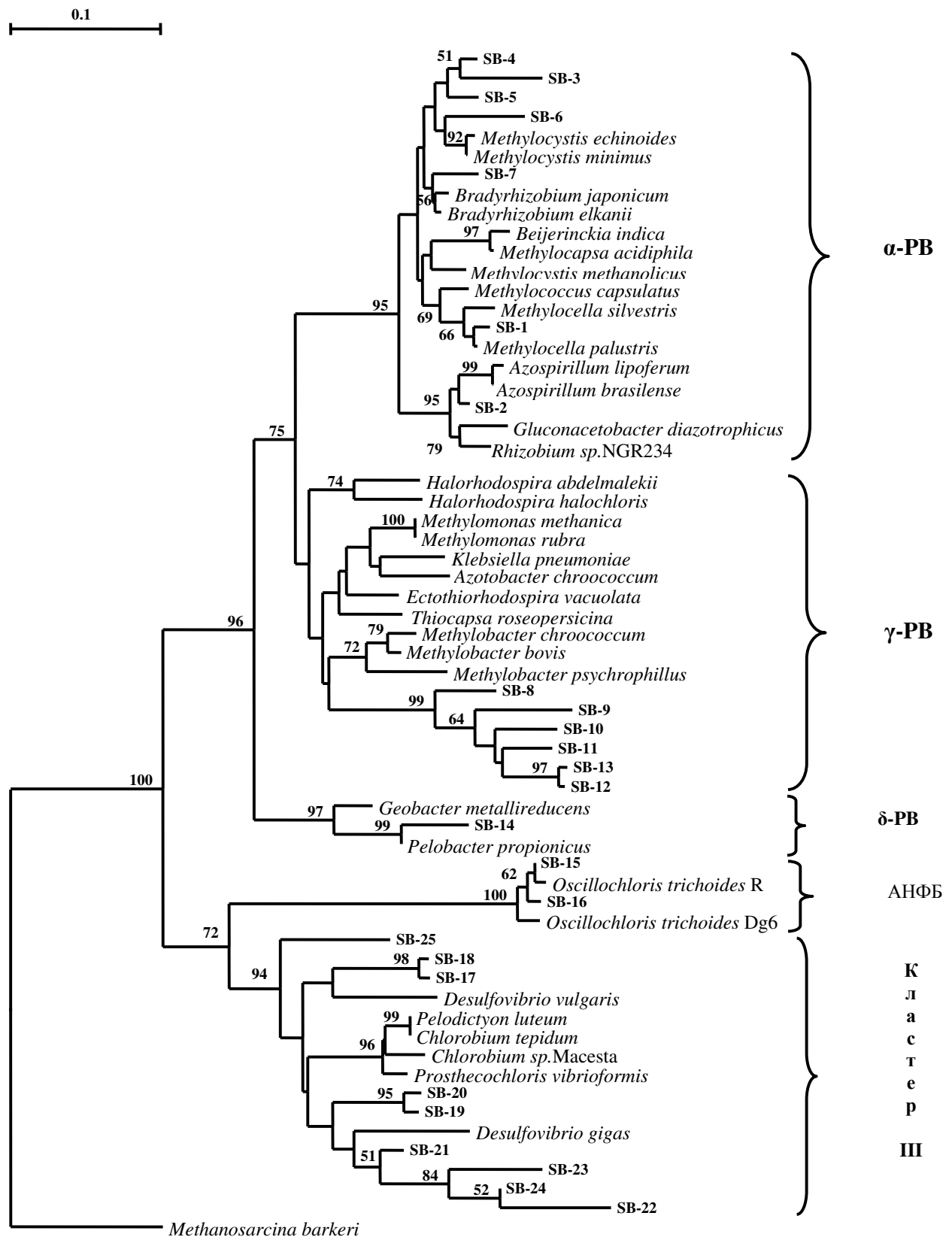


Рисунок 5. Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа транслированных последовательностей фрагментов генов *nifH*. Клоны, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 10 заменам на 100 аминокислотных остатков (эволюционным расстояниям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 500 альтернативных деревьев.

Довольно часто при анализе природных микробных сообществ diaзотрофов обнаруживается большое количество неидентифицируемых микроорганизмов, входящих именно в γ -подкласс Протеобактерий. Это было отмечено при изучении ризосферы риса (Ueda et al., 1995) и различных почвенных сообществ, а среди азотфиксаторов океана неидентифицируемые микроорганизмы, принадлежащие γ -Протеобактериям вообще составляют основной филотип (Zehr et al., 1998; Bird et al., 2005). В нашем исследовании мы также не смогли точно идентифицировать ни один клон из группы γ -Протеобактерий.

Сиквенс-тип SB-14 оказался близким к представителю δ -Протеобактерий *Pelobacter propionicus* из семейства Geobacteraceae (степень сходства между транслированными аминокислотными последовательностями составила 96%). На дендрограмме SB-14 и *P. propionicus* образовали общий кластер.

Сиквенс-типы SB-15 и SB-16 обнаружили наибольшее сходство с представителями группы АНФБ из рода *Oscillochloris*. Присутствие таких микроорганизмов в кислой торфяной почве (рН 3.5-4.2) было показано нами впервые. Уровень гомологии между транслированными аминокислотными последовательностями генов *nifH* *Osc. trichoides* и других известных азотфиксаторов составляет менее 74%, поэтому высокий уровень гомологии между сиквенс-типами SB-15, SB-16 и *Osc. trichoides* (97%) с большой долей вероятности может свидетельствовать о присутствии данного микроорганизма в исследуемом микробном сообществе. Дополнительное исследование, проведенное в нашей лаборатории, подтвердило присутствие в данном местообитании микроорганизмов, близких к роду *Oscillochloris*.

Представители остальных 9 сиквенс-типов (SB-17 – SB-25) оказались близки к азотфиксаторам, относящимся к так называемому кластеру 3 (Zehr et al., 2003). Этот кластер включает последовательности генов *nifH* отдаленных групп микроорганизмов, большинство из которых строгие анаэробы (сульфатредуцирующие микроорганизмы, зеленые серные прокариоты, клостридии). Все полученные в нашем исследовании сиквенс-типы из кластера 3 не обнаружили близкого родства с идентифицированными микроорганизмами, уровень гомологии транслированных аминокислотных последовательностей составил менее 90%. Кроме того, уровень гомологии последовательностей полученных клонов в большинстве случаев был одинаков с аналогичными последовательностями, как представителей группы зеленых серных микроорганизмов, так и представителей рода *Desulfovibrio*. Этот факт уже был отмечен и

другими авторами при исследовании различных diaзотрофных природных сообществ (Ueda et al., 1995; Ohkuma et al., 1999; Zani et al., 2000; MacGregor et al., 2001). Микроорганизмы из данного кластера, видимо, очень широко распространены в анаэробных или микроаэробных экологических нишах разных природных сообществ, однако точно идентифицировать их пока не представляется возможным.

Таким образом, в ходе нашего исследования мы выявили в образцах кислой торфяной почвы сфагнового верхового болота значительное разнообразие азотфиксирующих микроорганизмов, принадлежащих к различным филогенетическим группам. Полученные данные противоречат распространенному мнению о невысоком биоразнообразии микробных сообществ кислых торфяных почв и могут способствовать выделению и описанию новых микроорганизмов, а также применяться в дальнейших комплексных исследованиях болотных сообществ.

ВЫВОДЫ:

1. Разработан метод выделения ПЦР-пригодных препаратов ДНК из почв, существенно различающихся по своим физико-химическим характеристикам, в том числе с низкими значениями рН и богатых органическими веществами.
2. Существенно расширена база данных последовательностей генов *nifH* для ряда фототрофных микроорганизмов, и проведен их филогенетический анализ. По результатам анализа можно предположить, что некоторые нуклеотидные последовательности генов *nifH* некультивируемых микроорганизмов, представленные в базе данных GenBank, принадлежат фотосинтезирующим микроорганизмам.
3. На примере модельной системы метанотрофных накопительных культур показано, что результаты анализа генов *nifH* могут быть использованы для оценки биоразнообразия смешанных культур. Однако только одновременное использование нескольких методов позволяет получить более полные данные о составе исследуемых сообществ.
4. Впервые исследовано биоразнообразие азотфиксирующих прокариот в микробном сообществе кислой торфяной почвы сфагнового верхового болота. Впервые в кислой торфяной почве показано присутствие микроорганизмов, близких к *Oscillochloris* и *Azospirillum*.
5. На примере выявления *Azospirillum* в микробном сообществе торфяной почвы показано, что данные ПЦР-диагностики позволяют уверенно предсказывать наличие тех или иных прокариот в микробном сообществе.

Список работ по материалам диссертации:

1. Запороженко Е.В., Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв. Микробиология. 2006. 75 (1), 127-134.
2. Турова Т.П., Спиридонова Е.М., Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кеппен О.И., Кузнецов Б.Б., Ивановский Р.Н. Филогения аноксигенных нитчатых фототрофных

бактерий семейства *Oscillochloridaceae* на основании сравнительного анализа генов *rrs*, *cbbL* и *nifH*. Микробиология. 2006. 75 (2), 235–244.

3. **Слободова Н.В.**, Колганова Т.В., Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П., Кравченко И.К. Сравнительная характеристика метанотрофных накопительных культур с помощью серологических и молекулярных методов. Микробиология. 2006. 75 (3), 397-403.
4. Sizova M.V., Panikov N.S., Spiridonova E.M., **Slobodova N.V.**, Tourova T.P. Novel facultative anaerobic acidotolerant *Telmatospirillum siberiense* gen. nov. sp. nov. isolated from mesotrophic fen. Syst Appl Microbiol. 2006 Jul 27 (в печати).
5. **Slobodova N.**, Boulygina E., Kuznetsov B., Kravchenko I. Diazotrophic diversity of acid peat soil microbial communities. 6th European Nitrogen Fixation Conference. Toulouse, France, July 24-27, 2004, p. 109 (Abstracts).
6. **Слободова Н.В.**, Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Молекулярно-биологический анализ азотфиксирующих бактерий торфяной болотной почвы. Международная конференция «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения». Апатиты, Россия, 31 августа-3 сентября 2004 г. Материалы конференции, ч.2, стр.30.
7. **Slobodova N.**, Kolganova T., Boulygina E., Kuznetsov B., Tourova T., Kravchenko I. Complex analysis of methanotrophs diversity in mixed cultures isolated from Sphagnum peat bog. 8th International Symposium on Biogeochemistry of Wetlands. Gent, Belgium, Sept 14-17, 2003, p. 30 (Abstracts).
8. Ushakova N.A., Tourova T.P., **Slobodova N.V.** The gut bacteria of monogastric vertebrate herbivores, participating in cellulose destruction during the nitrogen deficiency. 9th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Leuven, Belgium, Sept 1-5, 2002, p.163 (Abstracts).
9. **Slobodova N.**, Boulygina E., Kuznetsov B., Tourova T., Marusina A., Kravchenko I. The application of universal *nifH* primers for analysis of N₂-fixing bacteria. 9th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Leuven, Belgium, Sept 1-5, 2002, p.48 (Abstracts).