

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОЙ МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ БАЗЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2010 С.И. Беликов¹, Н.В. Деникина¹, Н.Л. Белькова^{1,2}, Л.И. Черногор¹,
В.П. Саловарова², Е.В. Дзюба¹

¹Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

²Иркутский государственный университет

Поступила в редакцию 07.05.2010

Обоснованы возможность и необходимость расширения области применения молекулярно-генетических методов для решения экологических задач. Молекулярная экология представлена как основа методологической базы, позволяющей эффективно определять состав, оценивать состояние и контролировать реакцию исследуемых многокомпонентных биотических систем на изменения различных параметров среды в условиях *in vitro*. В качестве ключевых индикаторных групп для наземных и водных экосистем предложены сообщества микроорганизмов (на примере вируса клещевого энцефалита, водных микробных сообществ, ассоциированной микрофлоры рыб и симбиотической микрофлоры губок).

Ключевые слова: молекулярная экология, мониторинг окружающей среды, многокомпонентные биотические системы, симбиотическая микрофлора, сообщества микроорганизмов

В настоящее время все большую значимость приобретает концепция устойчивого развития, основанная на консенсусе трех основных точек зрения: экономической, социальной и экологической. Её реализация предусматривает формирование системы практических индикаторов, позволяющих не только дать оценку истинному положению дел в перечисленных сферах, но и определить направление и динамику общего тренда в перспективе. Среди национальных приоритетов устойчивого развития «Стратегия национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года» определила «экологию живых систем и рациональное природопользование, поддержание которых достигается за счет ... развития прогрессивных технологий». При этом «стратегическими целями обеспечения экологической безопасности и рационального

природопользования являются: сохранение окружающей природной среды и обеспечение ее защиты; ликвидация экологических последствий хозяйственной деятельности в условиях возрастающей экономической активности и глобальных изменений климата» [12]. Таким образом, одним из важнейших направлений деятельности научного сообщества и актуальной проблемой природопользования является определение методологической базы, позволяющей корректно и эффективно оценивать состав и состояние многокомпонентных биотических систем в условиях постоянного усиления антропогенного давления. Кроме того, требуемая методология должна обеспечивать возможность определения реакции исследуемой системы на изменения различных параметров среды в условиях лабораторного эксперимента. Экстраполяция полученных данных о функциональном ответе системы позволит с достаточной достоверностью прогнозировать развитие реальной ситуации, своевременно разработать и принять превентивные меры с целью сохранения биологического разнообразия и обеспечения самовосстановления экосистемы в целом.

Ранее мы представили результаты апробации современных подходов к экологическому мониторингу для оценки возможного социального ущерба от изменения состояния водоемов [5]. В качестве ключевых индикаторных групп рассматривали сообщества микроорганизмов и рыбное население.

Беликов Сергей Иванович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией аналитической биоорганической химии. E-mail: sergeibelikov47@gmail.com

Деникина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоорганической химии. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Белькова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории водной микробиологии. E-mail: belkovan@mail.ru

Черногор Любовь Ивановна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории водной микробиологии. E-mail: lchernogor@lin.irk.ru

Саловарова Валентина Петровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физико-химической биологии. E-mail: vsalovarova@rambler.ru

Дзюба Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологии рыб и водных млекопитающих. E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Цель настоящей работы: обоснование возможности и необходимости расширения области применения молекулярно-генетических методов для решения экологических задач.

В качестве ключевых индикаторных групп, как для наземных, так и для водных экосистем, мы предлагаем использовать сообщества микроорганизмов (в том числе симбиотическую и ассоциированную с многоклеточными организмами микрофлору). Экосистемный подход к оценке состояния среды дает возможность ранней диагностики ее изменений. Сигналом тревоги служит разбалансировка продукционно-деструкционных процессов, протекающих в основном благодаря сообществам микроорганизмов, одним из наиболее существенных компонентов живого населения планеты. С одной стороны, они играют важнейшую роль в процессах круговорота веществ и энергии в трофической цепи организмов, с другой – именно они (и симбиотические, и свободноживущие) мгновенно реагируют на любые изменения условий среды обитания [7, 17, 19]. Кроме того, именно специфические сообщества микроорганизмов и вирусов зачастую становятся одним из лимитирующих факторов при освоении новых территорий (природно-очаговые инфекции вирусного и бактериального генеза) [1].

Ранее использование сообществ микроорганизмов, как индикаторов, было затруднено, поскольку до появления молекулярно-биологических методов при изучении разнообразия организмов существовала проблема их видовой идентификации в многокомпонентных биотических системах. В настоящее время можно с уверенностью говорить о молекулярной экологии, как о новом направлении в биологии, оказывающем заметное влияние не только на отдельные классические науки, но и системную экологию в целом. Во многих группах организмов (прокариоты, грибы, простейшие, низшие водоросли и др.) в настоящее время валидно зарегистрировано не более 20% от предполагаемого числа видов. В связи с этим, молекулярные диагностические признаки являются идеальными для характеристики организмов и разработки рутинных аналитических процедур идентификации, позволяющих легко и быстро проводить определение не только видовой принадлежности организмов или характеристику филотипа (для микроорганизмов), но и популяционную принадлежность (для высших таксонов). Это особенно актуально при работе с объектами, идентификация которых затруднена из-за сильного механического и/или химического повреждения организмов (в случае анализа содержимого желудков) или из-за трудоемкого определения видовой принадлежности (икра рыб, личинки насекомых и т.д.) [8].

Трудно переоценить потенциал молекулярно-биологических методов при изучении состава многокомпонентных биотических систем «хозяин-симбионты первого порядка – симбионты второго порядка», включая «хозяин-вирус» *in situ* и их функционального статуса при изменении окружающей среды по экспрессии соответствующих генов. Существует масса ярких примеров эффективного использования возможностей молекулярной экологии: определение экологических характеристик взаимоотношений организмов-экстремофилов, обитающих на морском дне в районах «черных курильщиков»; характеристика метаболизма ряда монофагов (в частности, термитов), обеспечиваемого многоступенчатой системой симбионтов; использование растениями и животными вирусов эндосимбионтов в качестве защитных агентов [14, 16, 18, 22].

Молекулярно-экологические исследования вируса клещевого энцефалита. Клещевой энцефалит (КЭ) – одна из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций лесной зоны Евразийского континента [4]. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией и поражением центральной нервной системы [15]. Основными переносчиками ВКЭ являются клещи рода *Ixodes*, широко распространенные в умеренной зоне смешанных хвойно-широколиственных лесов Северного полушария [1]. Описаны 3 субтипа вируса: дальневосточный, европейский и сибирский. ВКЭ дальневосточного субтипа вызывает наиболее тяжелые формы заболевания с летальностью до 20-35%, а наименее вирулентным является вирус европейского субтипа с летальными исходами в единичных случаях. Однако принадлежность к определенному субтипу не позволяет прогнозировать тяжесть заболевания, т. к. во многих исследованиях было показано, что все субтипы ВКЭ могут вызвать полный спектр клинических проявлений инфекции [6, 9]. Таким образом, своевременная и специфичная диагностика КЭ *in situ* имеет огромное значение в профилактике и лечении этого заболевания [10]. При этом классические вирусологические методы достаточно трудоемки и длительны по времени выполнения, что затрудняет их применение для эпидемиологического мониторинга территорий. В современной практике успешно применяются методы ДНК-диагностики, специфичность которых достигает 100%, а чувствительность – 75-98%. Они позволяют детектировать генетический материал ВКЭ в исследуемых образцах при его самых низких концентрациях в течение нескольких часов [11]. Нами проведен молекулярно-генетический анализ коллекции штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа с различными клиническими проявлениями (проф. Г.Н. Леонова, НИИЭМ СО РАМН, г. Владивосток).

Разработана схема и адаптированы условия амплификации, определены полногеномные нуклеотидные последовательности. Сравнительный анализ выявил мутации, коррелирующие со степенью вирулентности. Полученные данные позволяют создать диагностический набор для детекции высокопатогенных вариантов вируса *in situ*, что представляется нам важным для корректной оценки потенциальной опасности природного очага [2]. Аналогичный подход может быть использован при разработке методологий мониторинга других вирусных инфекций человека и животных.

Молекулярные исследования сообществ микроорганизмов из различных мест обитания: генетическое разнообразие и функциональный статус. Современный арсенал методов молекулярной экологии позволяет определять реальный состав сообществ микроорганизмов методами амплификации и секвенирования фрагментов генов 16S (для прокариот) или 18S (для эукариот) рРНК. Изучение генетического разнообразия без культивирования значительно расширяет возможности исследователей, а внедрение технологии ПЦР в реальном времени помогает охарактеризовать структуру сообщества и оценить его функциональный статус. Последние данные по изучению микробных сообществ показали, что в природных экосистемах практически отсутствуют индивидуальные бактериальные клетки: микроорганизмы образуют ассоциации друг с другом; с органическими и неорганическими частицами; с эукариотическими организмами, – для повышения своих собственных ресурсов выживания. Идентификация и определение физиологического статуса «некультивируемых» бактерий является актуальной проблемой, учитывая, что многие патогенные штаммы способны длительное время сохраняться в лабораторных условиях в особом, «спящем» физиологическом состоянии. Разнообразие и физиологический статус отдельных групп микроорганизмов в природных экосистемах представляет несомненный интерес для исследователей, изучающих экологические проблемы водной микробиологии. В работе разработаны и использованы следующие методические подходы: для выявления доминирующих и некультивируемых гетеротрофных бактерий – культивирование на питательных средах и эксперимент по фильтрации-акклиматизации, соответственно; для характеристики разнообразия и оценки физиологического статуса микробных сообществ *in situ* – молекулярно-генетический анализ тотальной ДНК и селективное ингибирование внеклеточной ДНК; для характеристики структуры микробных сообществ – амплификация в режиме реального времени с группспецифичными праймерами на целевые группы микроорганизмов. Полученные результаты

позволяют определить спектр индикаторных групп микроорганизмов разного таксономического уровня для проведения экологического мониторинга пресных вод.

Кишечная микрофлора представляет собой еще одну многокомпонентную биотическую систему, исследование которой в настоящее время развивается в нескольких направлениях: установление качественного и количественного состава сообществ микроорганизмов и определение функциональной значимости их компонентов. Изучение генетического разнообразия кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* выявило невысокое разнообразие генотипов, среди которых отмечены представители как облигатных аэробных, так и анаэробных бактерий. Нами получены новые генотипы *Mycoplasma* и некультивируемых бактерий филогенетической группы Спирохеты, разработаны методы их количественной оценки в кишечниках рыб [3].

Молекулярные исследования сообществ микроорганизмов: состав и реакция на изменения среды. Одним из несомненных преимуществ молекулярно-экологического подхода является возможность в экспериментально контролируемых условиях исследовать влияние изменений параметров среды на состав и структуру сообществ микроорганизмов *in vitro*. В отличие от высших организмов, негативные последствия у которых зачастую проявляются по прошествии значительного времени, бактерии и протисты на такие изменения реагируют практически моментально. Так, одним из наиболее распространенных в настоящее время последствий антропогенного влияния является эвтрофикация водоемов. Мы провели серию экспериментов, имитирующих этот процесс в лабораторных условиях, с примморфами байкальской губки *Lubomirskia baicalensis*. Губки (Porifera) являются симбиотическими организмами, однако роль симбионтов в функционировании и эволюции губок до сих пор не ясна [20]. Поскольку установить характер взаимодействий симбионтов в естественных условиях практически невозможно, в лабораторной практике используют культуру клеток губок (примморфы). Агрегационная способность диссоциированных клеток губок была установлена ещё в классических опытах Wilson (1907) [21]. Примморфы по сути являются промежуточным звеном между единичной клеткой и сформировавшейся губкой и могут служить удобной моделью для решения многих проблем физиологии, клеточной и молекулярной биологии [13]. Отработаны условия получения долгоживущей истощенной культуры примморф *L. baicalensis*, молекулярно-генетическая идентификация эндосимбионтов с использованием универсальных рибосомных праймеров позволила установить генетическую

близость эукариот с группой хлорококковых водорослей *Pseudodictyosphaerium/Mychonastes*, прокариоты представлены родами *Bacillus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. При эвтрофикации среды (добавлении пептона) состав сообщества остался прежним, но его структура изменилась: зарегистрировано уменьшение количества копий фрагментов генов 18S рРНК (эукариот) и значительное увеличение 16S рРНК (прокариот), с последующей диссоциацией и гибелью приморфа. Аналогичные результаты были получены при повышении температуры культивирования. Показан лимитирующий характер этих параметров среды для байкальских губок и их симбиотических ассоциаций.

Выводы: молекулярная экология действительно может стать одной из основ методологической базы, позволяющей не только эффективно определить состав и оценить состояние многокомпонентных биотических систем, но и контролировать реакцию исследуемой системы на изменения различных параметров среды в условиях *in vitro*. К явным достоинствам этой методологии можно отнести высокую технологичность, обеспечивающую стандартизацию методик и возможность формализованной обработки результатов.

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта СО РАН №122, программы РАН №26, подпрограммы 1, проекта 26.13, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. ГК № 389П и гранта РФФИ №09-04-00977.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Алексеев, А.Н. Современное состояние знаний о переносчиках клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 5. – С. 21-26.
2. Беликов, С.И. Кодированные нуклеотидные последовательности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных из крови людей без клинических проявлений инфекции / С.И. Беликов, Г.Н. Леонова, И.Г. Кондратов и др. // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 356-363.
3. Белькова, Н.Л. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами / Н.Л. Белькова, Е.В. Дзюба, Е.В. Суханова, Т.А. Ханаева // Биология внутренних вод. – 2008. – № 2. – С. 91-94.
4. Гниель, Д. Ситуация по клещевому энцефалиту в мире. Вирус – возбудитель – заболевание и профилактика / Д. Гниель, М. Броекер // Клещевой энцефалит (к 65-летию открытия). – Владивосток, 2002. – С. 180-186.
5. Дзюба, Е.В. Современные подходы и методология экологического мониторинга в условиях водоема и в аквакультуре / Е.В. Дзюба, Н.Л. Белькова, Н.В. Деникина и др. // Известия Самарского научного центра РАН. – 2009. – № 11(1). – С. 466-471.
6. Злобин, В.И. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В.И. Злобин, М.М. Верхозина, Т.В. Демина и др. // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 6. – С. 4-13.
7. Компанцева, Е.И. Влияние рН на сообщества аноксифотобактерий в содовых озерах Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 872-878.
8. Кузнецов, К.Д. Определение видовой принадлежности обнаруженных в желудке черного хариуса коконов байкальских планарий путем сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена рибосомальной РНК / К.Д. Кузнецов, Е.В. Дзюба // Журнал общей биологии. – 1999. – Т. 60, №4. – С. 445-449.
9. Леонова, Г.Н. Молекулярное типирование штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от людей с различной степенью тяжести инфекции на территории юга Дальнего Востока России / Г.Н. Леонова, С.И. Беликов, Н.В. Кулакова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – № 2. – С. 32-36.
10. Миронов, И.Л. Диагностика клещевого энцефалита на современном этапе // Инфекционные болезни. – 2006. – Т. 4. – № 1. – С. 90-93.
11. Момыналиев, К.Т. Перспективы применения методов ДНК-диагностики в лабораторной службе / К.Т. Момыналиев, В.М. Говорун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 4. – С. 25-32.
12. Стратегия национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года Утверждена Указом Президента Российской Федерации от 12 мая 2009 г. № 537. – <http://www.scrf.gov.ru/documents/99.html>
13. Custodio, M.R. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death / M.R. Custodio, I. Prokic, R. Steffen et al. // Mech. Ageing. Dev. – 1998. – No 155. – P. 45-59.
14. Hongoh, Y. Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut / Y. Hongoh, V.K. Sharma, T. Prakash et al. // Science. – 2008. – V. 322. – P. 1108-1109.
15. Kaiser, R. Tick-Borne Encephalitis // Infect. Dis. Clin. N. Am. – 2008. – V. 22, No 3. – P. 561-575.
16. Marquez, L.M. A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance / L.M. Marquez, R.S. Redman, R.J. Rodriguez, M.J. Roossinck // Science. – 2007. – V. 315. – P. 513-515.
17. Nozhevnikova, A.N. Temperature dependence of methanogenesis pathway in lake sediment slurries enriched at four temperatures from 5 to 50°C and adaptation of psychrophilic methanogenic communities to high concentration of acetate / A.N. Nozhevnikova, V. Nekrasova, A. Ammann et al. // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – V. 62. – P. 336-344.
18. Oliver, K.M. Bacteriophages Encode Factors Required for Protection in a Symbiotic Mutualism / K.M. Oliver, P.H. Degnan, M.S. Hunter, N.A. Moran // Science. – 2009. – V. 325. – P. 992-994.
19. Shenderov, B.A. Modern condition and prospective host microecology investigations // Microb. Ecol. Health Dis. – 2007. – No 19. – P. 145-149.
20. Steindler, L. 16S rRNA Phylogeny of Sponge-Associated Cyanobacteria / L. Steindler, D. Huchon, A. Avni, M. Ilan // Appl. Environ. Microbiol. – 2005 – V. 71, No. 7. – P. 4127-4131.

21. *Wilson, H.V.* On phenomena of coalescence and re-generation in sponges // *J. Exp. Zool.* – 1907. – No 5. – P. 245-258.
22. *Woyke, T.* Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium / *T. Woyke, H. Teeling, N.N. Ivanova et al.* // *Nature.* – 2006. – V. 443. – P. 950-955.

MOLECULAR ECOLOGY AS A BASIS OF MODERN METHODOLOGICAL BASE OF AN ESTIMATION OF ENVIRONMENT CONDITION

© 2010 S.I. Belikov¹, N.N. Denikina¹, N.L. Belkova^{1,2}, L.I. Chernogor¹,
V.P. Salovarova², E.V. Dzyuba¹

¹Limnological Institute, SB RAS, Irkutsk

²Irkutsk State University

The opportunity and necessity of expansion the rehon of applixation the molecular-genetic methods for the decision of ecological problems are proved. The molecular ecology is presented as a basis of methodological base allowing effectively determine a compound, to estimate a condition and to monitor reaction of researched multicomponent biotic systems on changes of various parameters of environmental conditions *in vitro*. As the main display groups for ground and aquatic ecosystems the communities of microorganisms (on an example of vernal encephalitis virus, water microbial communities, acassociated microflorae of fishes and symbiotic microflora of sponges) are offered.

Key words: *molecular ecology, environmental monitoring, multicomponent biotic systems, symbiotic microflora, communities of microorganisms*

Sergey Belikov, Doctor of Biology, Professor, Chief of the Laboratory of Analytical Bioorganic Chemistry. E-mail: sergeibelikov47@gmail.com

Nataliya Denikina, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Analytical Bioorganic Chemistry. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Nataliya Belkova, Candidate of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow at the Laboratory of Water Microbiology. E-mail: belkovan@mail.ru

Lyubov Chernogor, Candidate of Biology, Research Fellow at the Laboratory of Water Microbiology. E-mail: lchernogor@lin.irk.ru

Valentina Salovarova, Doctor of Biology, Professor, Head of the Physical-Chemical Biology Department. E-mail: vsalovarova@rambler.ru

Elena Dzyuba, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Fishes and Water Mammals Biology. E-mail: e_dzyuba@lin.irk.ru