

УДК 57.08:579.26:574.5

АПРОБИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ ЦЕЛЕВЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРЕСНОВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

© 2012 Н.Л. Белькова^{1,2}, Е.В. Дзюба¹, Н.Н. Деникина¹, Ю.Л. Кондратистов³¹ Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск² Иркутский государственный университет³ Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория

Поступила в редакцию 14.05.2012

Актуальность использования молекулярно-генетических методов для проведения экологического мониторинга водных объектов обуславливает необходимость разработки методов количественной оценки состава микробных сообществ. Применение ДНК фага λ как внутреннего контроля показало, что для эффективного выделения суммарных нуклеиновых кислот из природных проб необходимо оценивать численность бактериальных клеток и анализировать концентрации, не превышающие 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. ПЦР в реальном времени позволила выявить невысокие концентрации энтерококков в поверхностных водах природных пресных водоемов Восточной Сибири в летний период по калибровочным кривым, основанным на концентрациях клеточных суспензий в КОЕ/мл. Детекция спектра таксономических групп и сравнительный анализ их значений СТ характеризуют структуру микробных сообществ и могут быть использованы для мониторинга их состояния и прогноза его изменений.

Ключевые слова: микробные сообщества, пресные водоемы, молекулярно-генетические методы, экологический мониторинг, специфичная амплификация в режиме реального времени

Сложность взаимосвязей в водных микробных сообществах, изменчивость их структуры и ее зависимость от сезонных и физико-химических параметров, растущая антропогенная нагрузка на водоемы, обуславливают необходимость совершенствования системы микробиологического мониторинга пресноводных экосистем [1, 2]. В настоящее время актуальной является задача создания современной методологической основы программы мониторинга, которая позволила бы не только обнаружить в тестируемых объектах патогенных и условно-патогенных бактерий, но и провести комплексную диагностику состояния пресноводных микробных сообществ с целью определения степени потенциальной опасности этой среды для здоровья человека [3, 4].

Известно, что бактерии играют значительную роль в биогеохимических процессах в озерных экосистемах и существенно влияют на качество озерных вод, однако доминирующие бактериальные таксоны, активно участвующие в этих превращениях, большей частью остаются не охарактеризованными [5]. Молекулярно-генетические

подходы, используемые для исследования бактериальные таксоны, активно участвующие в этих превращениях, большей частью остаются не охарактеризованными [5]. Молекулярно-генетические подходы, используемые для исследования разнообразия и состава бактериальных сообществ пресноводных экосистем, позволяют выявить численно доминирующие микроорганизмы и охарактеризовать их распространение. Ранее нами было показано, что для количественной оценки состава и структуры пресноводных микробных сообществ основными целевыми группами организмов должны быть протеобактерии, планктомицеты, цианобактерии и цитофаги-флавобактерии [6, 7].

Цель работы – апробация системы детекции целевых групп микроорганизмов в составе микробных сообществ различных пресноводных водоемов для их экологического мониторинга.

Материалы и методы. *Отбор проб и первичная пробоподготовка.* Для апробации системы отбирали пробы поверхностной воды из пресных водоемов Восточной Сибири и глубинную воду (оз. Байкал) в стерильные емкости объемом 5 л (табл. 1). Для проведения молекулярно-генетических исследований использовали бактериальный материал, сконцентрированный на бактериальном фильтре (диаметр пор 0,22 мкм, объем воды для фильтрации – не менее 1,5 л) и зафиксированный 70% этанолом. Выделение ДНК из чистых культур и бактериального материала, сконцентрированного на фильтре, проводили с помощью коммерческих наборов Bacterial genomic DNA isolation kit

Белькова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник. E-mail: nbelkova@gmail.com

Дзюба Елена Владимировна, кандидат биологических наук, исполняющая обязанности заведующей лабораторией. E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

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

Кондратистов Юрий Леонидович, заведующий отделом. E-mail: imv12004@mail.ru

(Ахуген, США) и ДНК-сорб Б (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) по адаптированным ранее методикам [8]. Для проведения количественных оценок использовали: 1) серию десятикратных разведений клеточной суспензии чистых культур (начальные концентрации

клеток составили $3,6 \times 10^8$ КОЕ/мл для *Enterococcus* sp., $2,3 \times 10^8$ – для *Aeromonas* sp. и $3,0 \times 10^8$ – для *Pseudomonas putida*), 2) ДНК фага λ , которую для контроля эффективности выделения ДНК добавляли в концентрациях 2,5, 12,5 или 25 мкг/мл к каждой аликвоте клеточной суспензии.

Таблица 1. Характеристика мест отбора проб и результаты детекции представителей зубактерий (EUB), таксономических групп гаммапротеобактерии (GAM) и цитофаги-флавобактерии (CF), а также количественная оценка *Enterococcus* sp. (ENT)

Название	Место обора (общее количество проб, шт.)	EUB*	GAM	CF	ENT (КОЕ/мл) среднее \pm СО
озеро Байкал, южная котловина, центральная станция					
LB-1	25 м (8)	14,48	25,79	32,88	нд**
LB-2	600 м (8)	16,86	24,97	25,69	нд
LB-3	1000 м (8)	18,49	23,00	30,50	нд
LB-4	1200 м (8)	13,67	28,56	28,41	нд
река Ангара, Братское водохранилище					
A1	пос. Железнодорожный (3)	13,45	23,11	25,11	0,01 \pm 0,005
A2	г. Усолье-Сибирское (3)	12,96	24,06	24,24	0,14 \pm 0,035
A3	г. Свирск (3)	12,82	22,17	30,04	0,22 \pm 0,061
A4	пос. Балаганск (3)	13,30	24,47	31,61	0,01 \pm 0,001
A5	пос. Ключи (3)	15,03	25,06	21,67	2,02 \pm 0,085
A6	ст. Подволочная (3)	16,18	24,08	21,99	6,43 \pm 0,977
A7	пос. Шумилово (3)	15,15	25,67	24,28	0,23 \pm 0,070
A8	ст. Наратай (3)	20,96	28,11	24,18	2,87 \pm 1,504
A9	ст. Долоновское расширение (3)	18,13	26,76	34,13	66,29 \pm 12,682
A10	плотина БрГЭС (3)	20,94	28,82	30,83	3,56 \pm 0,689
пресноводные озера Восточных Саян					
S1	оз. Изумрудное (12)	15,86	24,97	25,69	0,19 \pm 0,029
S2	оз. Малое Черное (8)	12,63	23,00	30,50	0,36 \pm 0,071
S3	оз. Большое Черное (12)	11,83	28,56	28,41	0,36 \pm 0,013
S4	оз. Перевальное (4)	12,12	25,99	23,38	1,27 \pm 0,143
S5	оз. Тухурен-Нур (4)	10,59	20,52	25,66	0,01 \pm 0,006
S7	оз. Аршантай-Нур (20)	14,22	24,43	18,43	0,01 \pm 0,005
холодные родники на территории национального парка «Алханай», Забайкальский край					
A11	Родник 1 (12)	18,30	28,39	24,55	0,08 \pm 0,009
A12	Родник 2 (12)	17,73	25,73	25,54	0,27 \pm 0,020
A13	Родник 3 (12)	20,94	26,31	28,11	0,07 \pm 0,006
A14	Ручей Сухой Убжогое (8)	18,13	25,71	26,76	0,04 \pm 0,003

Примечание: * Для детектируемых групп представлены значения СТ; ** не детектированы

Полимеразная цепная реакция. Структуры праймеров, использованных в работе, приведены в таблице 2 [8, 9]. Детекцию целевых групп микроорганизмов вели в режиме реального времени на амплификаторах Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и CFX[®]-Real Time System C1000 Thermal Cycler (BioRad, США), используя набор iTaq[™] SYBR[®] Green Supermix with ROX (BioRad, США) или TaqMan зонды для специфической детекции (табл. 2, Биосан, Новосибирск).

Результаты и обсуждение. При проведении микробиологического мониторинга важна не только детекция отдельных санитарно-показательных групп микроорганизмов, но и количественные оценки отдельных видов бактерий или представителей крупных таксонов. Для корректного анализа в этом случае необходимо введение внутренних контролей и калибровочных стандартов. С этой целью проведен эксперимент по использованию ДНК фага λ как внутреннего контроля при выделении суммарных нуклеиновых кислот. Из рис. 1

видно, что эффективность выделения ДНК коммерческим набором с сорбентом выше при невысоких концентрациях бактериального материала. Количественные оценки, проведенные с использованием ПЦР в реальном времени со специфичными зондами для *Enterococcus* sp. показали, что потери ДНК фага λ при использовании клеточных суспензий с концентрациями бактериальных клеток от 10^7 до 10^8 КОЕ/мл составляют до 70% и существенно ниже при концентрациях от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл – не более 20%. Аналогичные результаты были получены при неспецифической детекции ампликонов на групп-специфичных праймерах на зубактерии и гаммапротеобактерии, полученных для культур *Aeromonas* sp. и *Pseudomonas putida*. Таким образом, для эффективного выделения суммарных нуклеиновых кислот из природных проб необходимо оценивать численность бактериальных клеток и использовать концентрации, не превышающие 10^5 - 10^6 КОЕ/мл.

Таблица 2. Структуры праймеров, использованных в работе

Название праймера	Структура 5'–3'	Целевая филогенетическая группа
консервативные праймеры		
EUB500R	TTACCGCGGCTGCTGGFACG	эубактерии
EUB338L	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	эубактерии
специфичные праймеры		
GAM395L	CMATGCCGCGTGTGTGAA	гаммапротеобактерии
EUB296L	GAGAGGAAGGTCCCCAC	цитофаги-бактероиды
EUB412R	CGCTACTTGGCTGGTTTACG	цитофаги-бактероиды
ECST784L	AGAAATTCCAAACGAACCTTG	<i>Enterococcus</i>
ENC854R	CAGTGTCTACCTCCATCATT	<i>Enterococcus</i>
lambda11F	GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG	фаг λ
lambda11R	TTGACACCAGACCAACTGGTAATG	фаг λ
специфичные зонды для ПЦР в реальном времени		
EUB375	CCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCT	цитофаги-бактероиды
EUB975	CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC	цитофаги-бактероиды
GPL813TQ	TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA	<i>Enterococcus</i>

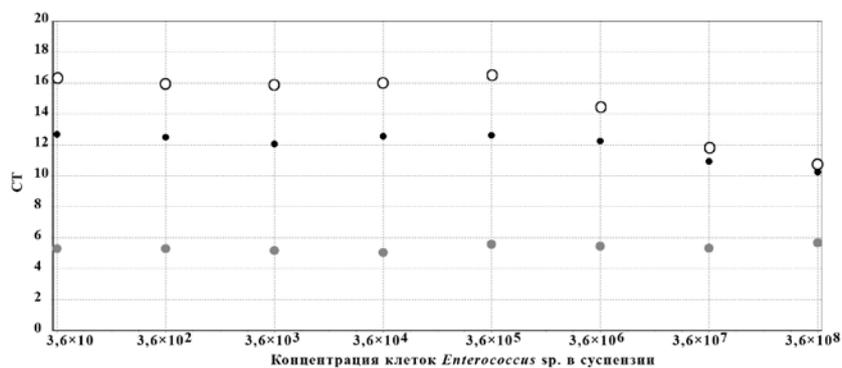


Рис. 1. Определение оптимальной концентрации исходной бактериальной суспензии и фаговой ДНК, используемой в качестве внутреннего контроля. Белые кружки – ДНК фага λ 25 мкг/мкл; черные – 12,5 мкг/мкл, серые – 2,5 мкг/мкл

При построении калибровочных кривых необходимо учитывать не только концентрацию выделенной ДНК, но и титр жизнеспособных клеток, который может быть учтен как число колониеобразующих единиц, дающих рост на питательной среде. Поэтому для разработки метода количественных оценок использовали суспензию *Enterococcus* sp. с известными концентрациями колониеобразующих единиц. График калибровочной кривой для *Enterococcus* sp., использованный для количественной оценки энтерококков в природных водах представлен на рис. 2, а результаты анализа в таблице 1. Следует отметить, что в поверхностных водах природных пресных водоемов Восточной Сибири в летний период отмечены невысокие концентрации энтерококков, а в глубинных водах озера Байкал в зимний период они не были детектированы с помощью данной диагностической системы.

Учитывая сложные цепи превращений, осуществляемые микроорганизмами в процессе биологического круговорота вещества, любое нарушение среды их обитания может повлечь за собой разрушение отлаженных закономерностей. Именно поэтому важен контроль за жизнедеятельностью микробных сообществ, и особенно тех представителей, которые могут резко изменить

экологическую или санитарную обстановку в отдельных природных водоемах. К таким группам относят представителей гамма-протеобактерий и цитофагов-флавобактерий.

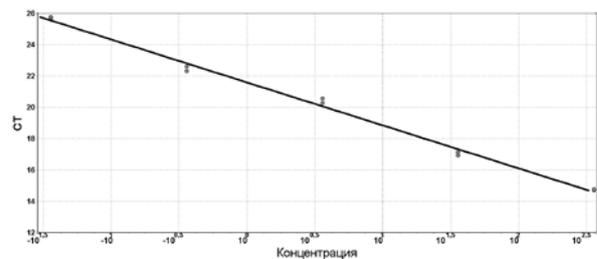


Рис. 2. График калибровочной кривой для детекции *Enterococcus* sp. с помощью специфичного TaqMan зонда. В реакцию использовали следующие концентрации клеток тестируемой культуры 3,6×10⁶, 3,6×10⁵, 3,6×10⁴, 3,6×10³ и 3,6×10² КОЕ/мл

В таблице 1 представлены результаты их детекции в сравнении с детекцией представителей эубактерий в разных природных водоемах. В данной работе для сравнения графиков накопления ампликонов использовали пороговый метод, определяли значение СТ, выраженное в циклах ПЦР,

характеризующее каждый график. Сравнивая эти значения, можно судить о начальной концентрации ДНК в исследуемых растворах: чем оно меньше, тем больше анализируемой ДНК в пробе. Следует отметить, что с помощью порогового метода детектированы невысокие концентрации гаммапротеобактерий и цитофагов-флавобактерий относительно значений для эубактерий во всех пресных озерах. Детекция спектра таксономических групп и сравнительный анализ их значений СТ позволяет характеризовать структуру микробных сообществ и ее изменение в зависимости от физико-химических условий водоемов.

Выводы: методы детекции микроорганизмов на основе видо- и групп-специфичной полимеразной цепной реакции могут быть использованы для характеристики разнообразия и состава природных микробных сообществ, а применение рутинных аналитических процедур позволяет провести количественные оценки с целью мониторинга их состояния и прогноза его изменений.

Работа выполнена в рамках ГК № 16.512.11.2130 Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Environmental Microbiology: Current technology and water application. Eds. K. Sen, N.J. Ashbolt. – Norfolk: Caister Academic Press, 2011. 316 p.
2. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / колл. Авторы // под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. 1080 с.
3. Дзюба, Е.В. Современные подходы и методология экологического мониторинга в условиях водоема и в аквакультуре / Е.В. Дзюба, Н.Л. Белькова, Н.Н. Деникина и др. // Известия Самарского научного центра РАН. 2009. Т. 11, №1(3). С. 466-471.
4. Бельков, С.И. Молекулярная экология как основа современной методологической базы оценки состояния окружающей среды / С.И. Бельков, Н.Н. Деникина, Н.Л. Белькова и др. // Известия Самарского научного центра РАН. 2010. Т. 12, №1(4). С. 1103-1107.
5. Newton, R.J. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria / R.J. Newton, S.E. Jones, A. Euler et al. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2011. Vol. 75, No. 1. P. 14-49.
6. Белькова, Н.Л. Технологический потенциал унификации молекулярно-генетического анализа структуры и функционального статуса микробных сообществ для мониторинга и биоиндикации / Н.Л. Белькова, Н.Н. Деникина, Е.В. Дзюба, Е.В. Суханова // Всероссийская научная школа для молодежи «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции», 18-25 октября 2010 г. – Владивосток, 2010. С. 77-82.
7. Белькова, Н.Л. Разработка системы праймеров разного уровня специфичности для определения состава и структуры микробных сообществ / Н.Л. Белькова, Е.Б. Матюгина, Н.Н. Деникина // Материалы II международной научно-практической конференции «Проблемы современной биологии». – М.: Изд-во «Спутник+», 2011. С. 74-79.
8. Белькова, Н.Л. Введение в молекулярную экологию микроорганизмов: Учебно-методическое пособие / Н.Л. Белькова, А.М. Андреева. – Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. 91 с.
9. Frahm, E. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of Enterococcus spp. and Escherichia coli in water samples / E. Frahm, U. Obst // J. Microbiol. Methods. 2003. Vol. 52. P. 123-131.

APPROBATION OF MARKER GROUPS DETECTION SYSTEM OF MICROORGANISMS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING OF FRESH-WATER ECOSYSTEMS

© 2012 N.L. Belkova^{1,2}, E.V. Dzyuba¹, N.N. Denikina¹, Yu.L. Kondratistov³

¹Limnological Institutes SB RAS, Irkutsk

²Irkutsk State University

³Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory

The urgency of use the molecular and genetic methods for carrying out environmental monitoring of water objects causes need of development the methods of quantitative assessment of microbial communities structure. Application of phage λ DNA as internal monitoring showed that for efficient selection of integral nucleic acids from natural tests it is necessary to estimate number of bacteriemic cells and to analyze the concentration which are not exceeding 10^5 - 10^6 CFU/ml. PCR in real time allowed to reveal low concentration of enterococci in the surface water of natural fresh reservoirs at Eastern Siberia during the summer period according to the calibration curves based on concentration of cellular suspensions in CFU/ml. Detection a range of taxonomic groups and comparative analysis of their CT values characterize structure of microbial communities and can be used for monitoring of their condition and forecast of its changes.

Key words: *microbial communities, fresh reservoirs, molecular and genetic methods, environmental monitoring, specific amplification in real time*

Nataliya Belkova, Candidate of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow. E-mail: nlbelkova@gmail.com

Elena Dzyuba, Candidate of Biology, Acting as Chief of the Laboratory. E-mail: e_dzyuba@lin.irk.ru

Nataliya Denikina, Candidate of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Yuriy Kondratistov, Chief of the Department. E-mail: imvl2004@mail.ru