



УДК 579.26:631.461

© 2012

М. В. Патика, Т. І. Патика,
член-кореспондент НАН України І. П. Григорюк,
Ю. В. Круглов

Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму метагеномних нуклеотидних послідовностей ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* і прокаріотного комплексу ґрунтів

*Наведено результати щодо можливості метагеномних досліджень поліморфізму нуклеотидних послідовностей ентومопатогенних бактерій групи *Bacillus thuringiensis* і прокаріотного комплексу ґрунтів. На базі клонованих генів 16S рРНК ентومопатогенних бактерій *B. thuringiensis* проведено порівняльний філогенетичний аналіз внутрішньовидових взаємозв'язків біоваріантів (*var. thuringiensis, darmstadiensis* та *israelensis*). Встановлено наявність штамового поліморфізму в середині групи досліджуваних ентомопатогенів. Методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (tRFLP) здійснено порівняльний аналіз за 16S рРНК мікробного комплексу дерново-підзолистого ґрунту. З'ясовано особливості філогенетичних профілів і оцінено різноманіття прокаріотних мікроорганізмів. Виявлено генотипи, які не культивуються мікробіологічними методами.*

У класичній екологічній тріаді “організм–взаємодія–довкілля” наша увага була сконцентрована на проблемах довкілля, але на рубежі століть актуальності набули нагальні проблеми дослідження та збереження біорізноманіття. Встановлено, що біорізноманіття сприяє колообігу, очищенню природних вод, збереженню ґрунтів, стабільності клімату, забезпечує функціонування природних екосистем, населення продуктами харчування, ліками та сировиною для промисловості тощо. Під впливом зростаючого антропогенного навантаження на середовище і внаслідок швидкого розвитку негативних (дестабілізуючих) процесів екологічна свідомість людини за короткий термін зробила “крок” від “впевненості у своїх силах” до розуміння “залежності нашого майбутнього від долі багатьох видів тварин, рослин, мікроорганізмів, що населяють Землю” [1, 2].

Різноманіття організмів (біорізноманіття на таксономічному рівні, або видове різноманіття) є найважливішим показником стану біосфери та екосистем, що її складають. Саме завдяки біологічному різноманіттю створюється структурно-функціональна організація екологічних систем, яка забезпечує їх стабільність і стійкість до змін навколишнього середовища та антропогенного навантаження. За підрахунками фахівців, у світі існує близько 13 млн видів рослин, тварин та мікроорганізмів, які є біорізноманіттям нашої планети. Біорізноманіття України об'єднує понад 72 тис. видів флори, мікробіоти та фауни. Флора і мікробіота налічує понад 27 тис. видів, у тому числі грибів і слизовиків — 15, водоростей — 5, лишайників — 1,2, мохів — 800 і судинних рослин — 5,1 тис. видів, включаючи найважливіші культурні види. Фауна нараховує понад 45 тис. видів, у тому числі комах — 35 тис., членистоногих без комах — 3,4, черв'яків — 3,2 тис.; хребетні представлені рибами і круглоротими (170 видів й підвидів), земноводними (17 видів), плазунами (21 вид), птахами (близько 400 видів) та ссавцями (108 видів) [3, 4].

За оцінками експертів, ще не описано одну третину видів, здебільшого грибів та членистоногих. Фрагментарні наші знання також щодо видового та функціонального різноманіття ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі тих, що можуть продукувати ферменти, амінокислоти, антимікробні метаболіти та інші біологічно активні речовини з лікувальними, профілактичними та захисними властивостями. За допомогою новітніх молекулярно-генетичних методів досліджень встановлено, що мікроорганізмів нараховується набагато більше. Аналіз полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) — ампліфікації основного філогенетичного маркера (гена 16S рРНК) дає можливість порівнювати структуру мікробних угруповань і оцінювати бактеріальне різноманіття в ґрунті, виявляти нові види мікробіоти, які до теперішнього часу не культивували на поживних елективних середовищах, а також не виділяли в чисті культури [5]. Визначено, що домінуюча частина мікробних угруповань у ґрунтах представлена складним комплексом різноманітних морфотипів та фізіологічних груп. Нині класичними мікробіологічними методами описано менше 10% біорізноманіття. Отже, загальна тенденція в екології мікроорганізмів — це застосування сучасних і оптимізованих методів молекулярної біології щодо вивчення біорізноманіття мікроорганізмів у природних умовах існування. При цьому значна увага приділяється ґрунту — як самостійному природному тілу та живому організму і разом з тим як складній за своєю структурою екосистемі.

З огляду на це основною метою нашої роботи було здійснити порівняльний філогенетичний аналіз за 16S рРНК різних біологічних варіантів ентомопатогенних бактерій групи *Bacillus thuringiensis* і оцінити видові зміни прокаріотного комплексу підзолистих ґрунтів за умов тривалого сільськогосподарського використання (метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів — tRFLP) для ґрунтового вивчення біорізноманіття мікробіоти та екології мікробних угруповань ґрунту.

Матеріали і методи. Як модельні мікроорганізми використовували чисті культури ентомопатогенних бактерій групи *Bacillus thuringiensis* різних біоваріантів (серотипів) — *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (H_1) і *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* (H_{10}), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (H_{14}), які виявляють ентомоцидну, ентомотоксичну та ларвіцидну активність стосовно комах різних таксономічних видів (колекція ВНДІСГМ РАСГН).

Мікробний комплекс ґрунтів вивчали на базі тривалих стаціонарних польових дослідів, закладених в 1912 р. (Московська сільськогосподарська академія ім. К. А. Тімірязєва).

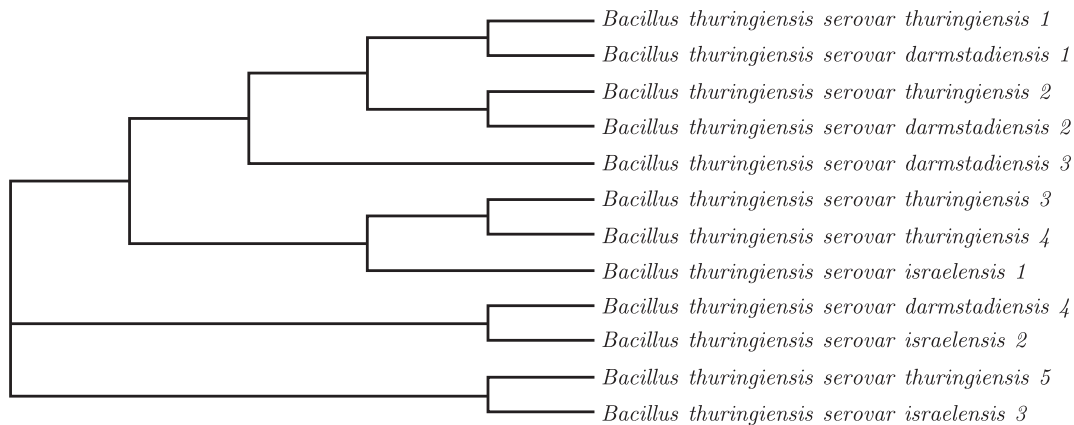


Рис. 1. Філогенетичний зв'язок ентомопатогенів на основі аналізу послідовностей генів 16S рРНК

Відпрацьована оригінальна методика екстракції тотальної ДНК мікроорганізмів, за основу якої був взятий метод J. J. Doyle, J. L. Doyle [5–7]. Електрофоретичне розділення одержаних зразків ДНК проводили в 1%-му агарозному гелі. Візуальну детекцію зразків ДНК і очищення ґрунтової ДНК від домішок гумінових кислот здійснювали за методом D. Moreira [8].

Виділену ДНК ентомопатогенів *B. thuringiensis* використовували як матрицю в ПЛР з праймерами SSU-642-F HAATHYGTGCCAGCAGC та SSU-1445-R GTCRTCCYDCCTTC-CTC (за стандартними протоколами). Продукти ампліфікації застосовували для клонування у вектор *pAL-TA* [9, 10].

ПЛР з використанням ґрунтової ДНК проводили флуоресцентно-міченими праймерами Eu3. Рестрикцію отриманих ампліконів здійснювали за допомогою синтетичних ендонуклеаз (Hae III, Msp I).

Секвенування отриманих клонованих фрагментів 16S рРНК виконували в автоматичному капілярному секвенаторі CEQ 8000 Genetic Analysis System (“Beckman Coulter”, США) згідно з рекомендаціями виробника. Визначали інтенсивність флуоресценції термінального фрагмента і будували пік, який був пропорціональний кількості ДНК й відповідав геному кожної таксономічної одиниці у зразку. Для видової класифікації фрагментів tRFLP використовували програму TRFLP Fragsort. Крім цього, аналізували нуклеотидні послідовності та перевіряли їх ідентичність з відповідними послідовностями 16S рРНК варіантів *B. thuringiensis* (база даних GenBank). Аналіз результатів секвенування здійснювали за допомогою програми Vector NTI Advance. Статистичну обробку даних проводили з використанням комп'ютерних програм із пакета Excel.

Результати та їх обговорення. У результаті проведеного порівняльного філогенетичного аналізу внутрішньовидових взаємозв'язків ентомопатогенних бактерій групи *B. thuringiensis* нами встановлено наявність штамового поліморфізму в середині групи. На дендрограмі (рис. 1) видно наявність зв'язку між штамми 1, 10 та 14 серотипів, а також розподіл на три основні кластери, які відповідають шести генотипам.

У генетичному плані найбільш близькоспорідненими виявилися три генотипи першого кластеру з рівнем спорідненості 90,0–94,0% (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis* та *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis*). Штами, які мають ларвіцидні властивості стосовно кровосисних комарів і мошок (*B. thuringiensis* var. *israelensis*), виявилися в 2 та 3 кластерах з найменшим

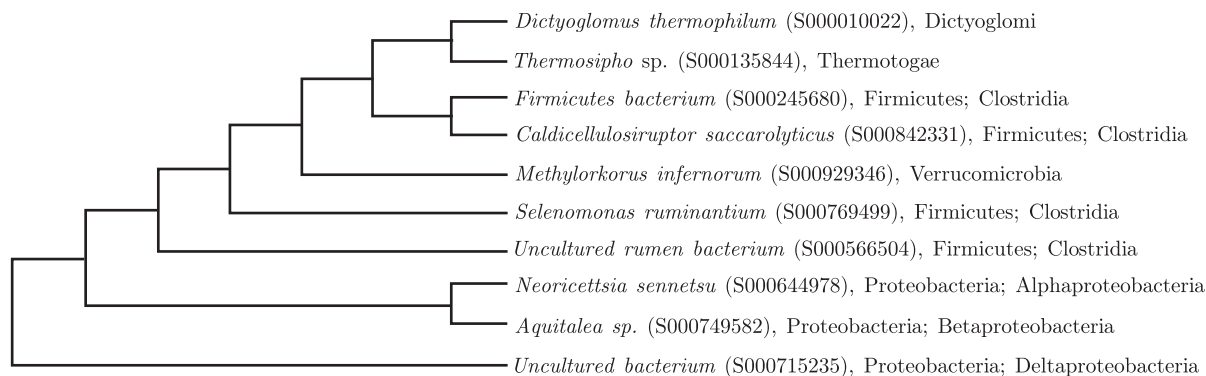


Рис. 2. Вплив довготривалої культури *Linum usitatissimum* L. у сівозміні з використанням мінеральних добрив на різноманіття прокаріотного комплексу дерново-підзолистого ґрунту

(до 70,0%) рівнем спорідненості за 16S рРНК. Чіткого генетичного відокремлення *B. thuringiensis* 10 і 14 серотипів нами не виявлено.

Аналіз профілів tRFLP показав наявність значної різниці в кількості і структурі розподілу виявлених генотипів. Топологія розподілу на дендрограмі прокаріотів ґрунтового комплексу у варіанті “льон-довгунець + NPK” засвідчує наявність двох основних кластерів. Один з них складається з шести підкластерів, яким відповідають 10 домінуючих генотипів (у їх складі види, що не культивуються на поживних середовищах, а також ряд ґрунтових мікроорганізмів з родів *Firmicutes*, *Methylothermobacterium*, *Selenomonas* тощо) (рис. 2).

У порівнянні з варіантом “льон-довгунець + NPK” істотно збільшилось генетичне різноманіття прокаріотних видів ґрунтового мікробного комплексу при вирощуванні у сівозміні озимого жита із застосуванням мінеральних добрив (до п’яти основних кластерів). І найвище різноманіття домінуючих видів спостерігалось у варіанті “конюшина + NPK”, що пов’язано з відновленням сприятливого поживного режиму ґрунту (рис. 3).

Варіант “чистий пар” за кількістю кластерних домінуючих видів наближався до сівозмінних варіантів. При цьому значну частину домінуючих генотипів складали види, які не культивуються (рис. 4).

Порівняльна оцінка генетичних профілів tRFLP і одержаних на їх основі дендрограм видового біологічного різноманіття прокаріот дерново-підзолистого ґрунту під посівами сільськогосподарських культур показала, що в умовах сівозміни змінюється видовий склад і структура мікробіоти та домінуючих форм. Встановлено, що беззмінна культура рослин призводить до збіднення генетичних ресурсів і зміни якісного складу ґрунтової мікробіоти. Ряд еубактеріальних філотипів елімінує з домінуючих форм мікробного ценозу. Проведений нами аналіз біорізноманіття ґрунтових мікроорганізмів виявив специфічність існуючих природних угруповань, які формуються під впливом агрофітоценозів та агроприймів.

Таким чином, у результаті вивчення біорізноманіття ґрунтових мікроорганізмів за допомогою сучасних молекулярно-генетичних методів (аналізи філогенетичних взаємозв’язків, поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів) виявлено генетично однорідні лінії бактерій різних біоваріантів (патотипів), поліморфізм у середині групи мікроорганізмів (наприклад, одного виду) і у комплексі видів ґрунтової мікробіоти в природних екосистемах.

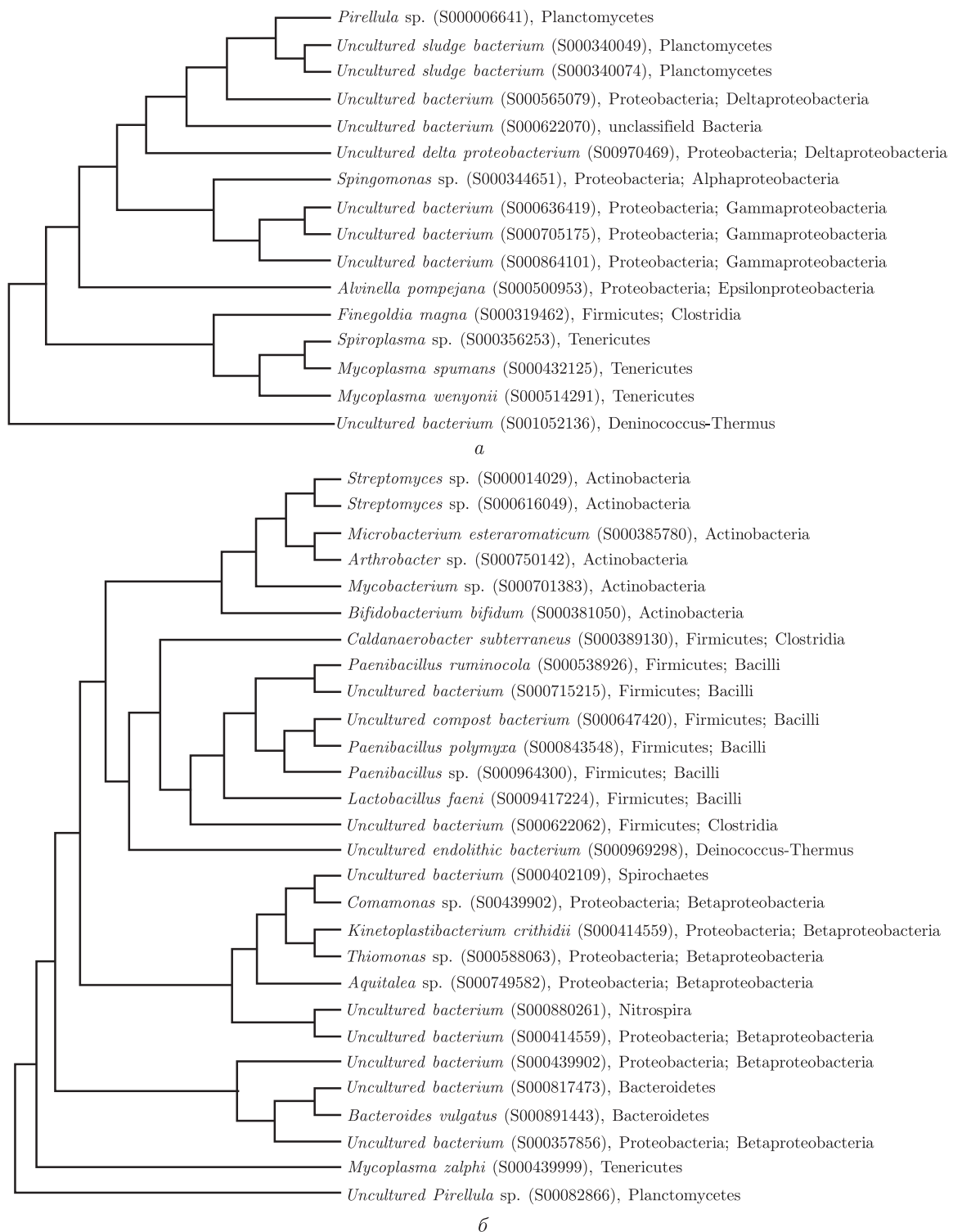


Рис. 3. Вплив довготривалої культури озимого жита (а) та конюшини (б) у сівозміні з використанням мінеральних добрив на різноманіття прокариотного комплексу дерново-підзолистого ґрунту

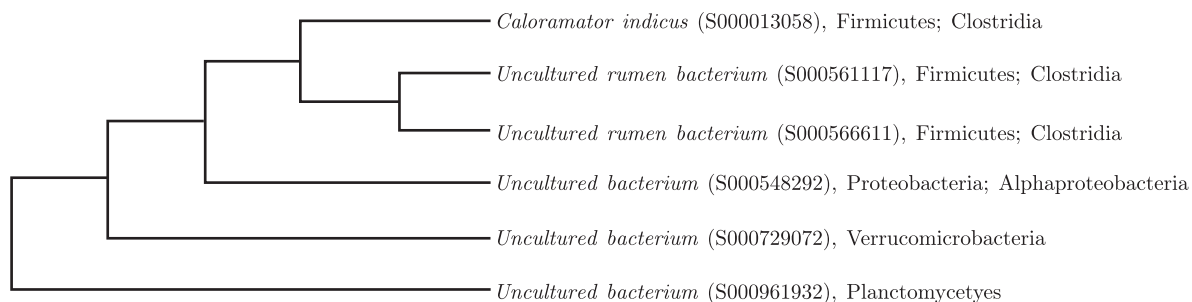


Рис. 4. Вплив чистого пару на різноманіття прокариот дерново-підзолистого ґрунту

Вивчення метагеномних нуклеотидних послідовностей мікроорганізмів важливо для порівняння структури угруповань, виявлення новітніх генотипів, оцінки адаптивного потенціалу мікрофлори ґрунту і з'ясування їх ролі в розвитку рослин і функціонуванні ґрунтових процесів.

Робота виконана при підтримці гранту Президента України № GP/F32/0016.

1. Бродский А. К. Введение в проблемы биоразнообразия. – Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2002. – 144 с.
2. Одум Ю. Основы экологии / Под ред. Н. П. Наумова. – Москва: Мир, 1975. – 733 с.
3. Концепція Загальнодержавної програми збереження біорізноманіття на 2005–2025 роки, затверджена розпорядженням Кабінету Міністрів України від 22 вересня 2004 р. № 675-р // Офіц. вісн. України. – 2004. – № 38. – С. 2524.
4. Живая планета – 2010. Биоразнообразие, биомасса и развитие / WWF. – 2010. – 61 с.
5. Patyka N. V., Kruglov Yu. V. TRFLP Profile of the Assemblage of Prokaryotic Microorganisms in Podzolic Soils // Rus. Agr. Sci. – 2008. – **34**, No 6. – P. 386–388.
6. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1987. – **12**. – P. 13–15.
7. Yeates C., Gillings M. R., Davison A. D. et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification // Biol. procedur. online. – 1998. – **1**, No 1. – P. 40–47.
8. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // Nucl. Acids Res. – 1998. – **26**, No 13. – P. 3309–3310.
9. Joung K. B., Cote J. C. Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragments length polymorphism // Appl. Microbiol. – 2001. – **90**. – P. 115–122.
10. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: A laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982. – 545 p.

Національний університет біоресурсів
і природокористування України, Київ
Інститут садівництва НААН України, Київ
Державна наукова установа Всеросійський
науково-дослідний інститут сільськогосподарської
мікробіології РАН, Санкт-Петербург, Пушкін

Надійшло до редакції 15.07.2011

Н. В. Патыка, Т. И. Патыка,

член-корреспондент НАН Украины И. П. Григорюк, Ю. В. Круглов

Молекулярно-генетический анализ полиморфизма метагеномных нуклеотидных последовательностей энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* и прокариотного комплекса почв

*Приведены результаты относительно возможности метагеномных исследований полиморфизма нуклеотидных последовательностей энтомопатогенных бактерий группы *Bacillus thuringiensis* и прокариотного комплекса почв. На базе клонированных генов 16S рРНК энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis* проведен сравнительный филогенетический анализ внутривидовых взаимосвязей биовариантов (var. *thuringiensis*, *darmstadiensis* и *israelensis*). Установлено существование штаммового полиморфизма внутри группы исследуемых энтомопатогенов. Методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (tRFLP) осуществлен сравнительный анализ по 16S рРНК микробного комплекса дерново-подзолистой почвы. Выявлены особенности филогенетических профилей и оценено разнообразие прокариотных микроорганизмов. Выявлены генотипы, которые не культивируются микробиологическими методами.*

N. V. Patyka, T. I. Patyka,

Corresponding Member of the NAS of Ukraine I. P. Grygoryuk, Yu. V. Kruglov

The molecular-genetic analysis of the polymorphism of metagenomic nucleotide sequences of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* and a procaryotic complex of soils

*Results concerning the possibility to research the metagenomic polymorphism of nucleotide sequences of entomopathogenic bacteria of the group *Bacillus thuringiensis* and a procaryotic complex of soils are presented. On the basis of the cloned genes 16S rRNA of entomopathogenic bacteria *B. thuringiensis*, the comparative phylogenetic analysis of intraspecific interrelations of biovariants (var. *thuringiensis*, *darmstadiensis* and *israelensis*) is performed. Presence of the polymorphism of strains in the middle of the group of investigated entomopathogenes is established. The method of polymorphism of lengths of restriction fragments (tRFLP) is used in the comparative analysis of a microbial complex of turf-podzolic soil by 16S rRNA. Features of phylogenetic profiles are found out, and a variety of procaryotic microorganisms is estimated. The genotypes which are not cultivated by the microbiological methods are revealed.*