

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOTOBACTER*, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ, МЕТОДОМ ПЦР

Мынбаева Б.Н.¹, Сейдалина А.Б.¹, Кулмамбетова Г.Н.², Курманбаев А.А.³

¹Казахский национальный педагогический университет им. Абая, г. Алматы, Казахстан, e-mail: bmynbayeva@gmail.com, Luckyai@list.ru

²Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан, e-mail: gulmirakn@gmail.com

³Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан, e-mail: askar_k_58@mail.ru

Из почв г. Алматы были выделены 2 штамма свободноживущих азотфиксирующих бактерий. Изучаемые микроорганизмы оказались чувствительными к присутствию в почвах тяжелых металлов (Pb, Cd, Cu, Zn). В транспортных и промышленных урбаногемах со значительным содержанием тяжелых металлов мы отметили минимальную численность колоний аэробных азотфиксирующих бактерий с минимальными размерами их диаметра. Количество колоний в городских почвах уменьшилось на 35–46 % по сравнению с фоновой почвой, взятой за городом. Следовательно, эта бактериальная культура обладала индикаторными свойствами по отношению к тяжелым металлам.

Выделенные штаммы чувствительной к тяжелым металлам культуры были определены до рода *Azotobacter* с помощью культурально-морфологических признаков. Данные молекулярно-генетического анализа последовательностей выделенной ДНК показали принадлежность одного из них (шт.1) к виду *A.chroococcum*, на основании 99 % гомологии между секвенированными нами и депонированными в базу данных GeneBank последовательностями. Таким образом, было подтверждено, что расшифрованные нами нуклеотидные последовательности соответствуют виду *A.chroococcum*.

Ключевые слова: азотфиксирующие бактерии, тяжелые металлы, праймер, ДНК, ПЦР.

IDENTIFICATION OF TYPE ACCESSORY OF BACTERIA *AZOTOBACTER*, SENSITIVE TO HEAVY METALS, BY PCR

Mynbayeva B.N.¹, Seidalina A.B.¹, Kulmambetova G.N.², Kurmanbayev A.A.³

¹Kazakh National Pedagogical University named of Abai, Almaty, Kazakhstan, e-mail: bmynbayeva@gmail.com, Luckyai@list.ru

²National Center of Biotechnology, Astana, Kazakhstan, e-mail: gulmirakn@gmail.com

³Institute of Microbiology and Virology, SK MES, Almaty, Kazakhstan, e-mail: askar_k_58@mail.ru

From Almaty city soils were isolated 2 strains of free-living nitrogen-fixing bacteria. The studied organisms were sensitive to the presence of heavy metals (Pb, Cd, Cu, Zn) in soils. In the transport and industrial urban soils with a high content of heavy metals, we noted the minimum number of aerobic nitrogen-fixing bacteria's colonies with a minimum size of their diameter. The number of colonies in urban soils was reduced by 35–46 % compared to the background soil, taken outside the city. Consequently, the bacterial culture had indicator properties in relation to heavy metals.

Sensitive to heavy metals isolates were identified to the genus *Azotobacter* by culture-morphological features. The data of molecular genetic analysis of sequences of isolated DNA showed accessory of one of them (sp.1) to the form *A.chroococcum* on the basis of 99% homology between the sequenced by us and deposited in GeneBank database sequences. Thus, it was confirmed that the decrypted by us nucleotide sequences correspond to the form *A.chroococcum*.

Key words: nitrogen-fixing bacteria, heavy metals, primers, DNA, PCR.

Введение

Современные тенденции развития микробиологии включают, наряду с совершенствованием традиционных методов, активное использование молекулярно-биологических подходов для изучения генетических особенностей микроорганизмов.

Многие исследователи используют методы ПЦР и системы олигонуклеотидных праймеров для определения микроорганизмов до вида с помощью амплификации генов отдельных микроорганизмов, например, для определения цианобактерий [12, 2, 8].

В настоящее время внимание исследователей привлекают микроорганизмы-индикаторы состояния почвенных экосистем при воздействии на них различных загрязнителей. В микробиологическом мониторинге исследователи часто используют бактериальные культуры, рост и развитие которых находится в зоне оптимума, т.е. требуют благоприятных условий почвенной среды. К таким чувствительным формам (индикаторам) относится *Azotobacter chroococcum*, который можно обнаружить только в высоко плодородных почвах с оптимальными для развития растений условиями [7, 5, 9].

Целью настоящей работы явилось определение нуклеотидных последовательностей генов двух штаммов *Azotobacter*, выделенных из почв г. Алматы, с помощью системы праймеров, позволяющей амплифицировать участки генов, достаточные для идентификации микроорганизмов до вида.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи: 1) выделить из почвенных образцов г. Алматы свободноживущие азотфиксирующие бактериальные штаммы и идентифицировать их до рода; 2) с помощью праймеров определить нуклеотидные последовательности генов двух штаммов *Azotobacter*, позволяющие амплифицировать участки этих генов, достаточные для идентификации микроорганизмов; 3) определить эти штаммы до вида на основе анализа структуры генов.

Объекты и методы исследования

Использованные сокращения: ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота, ПЦР – полимеразная цепная реакция, дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ТАЕ буфер – буферный раствор, содержащий смесь Трис-НСl, уксусной кислоты и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), п.н. – пара нуклеотидов, GeneBank – база данных, содержащая последовательности ДНК и расположенная на сервере Национального центра биотехнологической информации США.

Штаммы и условия культивирования. Для определения видовой принадлежности использовали 2 штамма (2 изолята) азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azotobacter*, которые выделили из почв г. Алматы, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ) [4]. Клетки штаммов *Azotobacter* культивировали при 28–31 °С на твердой безазотистой среде Эшби для изучения их морфологических и физиологических характеристик [2], а также для выделения единичных колоний при проведении ПЦР-анализа.

Выбор праймеров. Был проведен поиск нуклеотидных последовательностей геномов *Azotobacter* в международной базе данных, содержащей последовательности ДНК (GeneBank). Процедуру элаймента проводили с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor. На основании результатов были выбраны консервативные участки последовательностей гена *Azotobacter*.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров

Праймер	Последовательность (5'-3')
16s rRNA (forward - 8f)	5'-AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3'
16s rRNA (revers - 806R)	5'-ggACTACCAgggTATСТААТ-3'

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК выделяли по методу R.Boom и др. [9], согласно протоколу Miniprep (Promega, USA) с использованием в качестве хаотропного агента буфер с гуанидин-тиоцианатом, в состав которого входили: 120 г гуанидин-тиоционата, 2,6 г тритон X-100, 100 мл 0,1 М Трис-НСl (рН 6,4 при 65°C), 22 мл 0,2М ЭДТА (рН 8,0). В качестве сорбента был использован диоксид кремния, забуференный соляной кислотой. В состав первого промывочного буфера входило 120 г гуанидин-тиоционата в 100 мл Трис-НСl (рН 6,4, 65°C). В качестве отмывочного буфера от хаотропного агента был использован 70 % этанол. Данная серия отмывок позволила избавиться от ингибиторов и клеточных элементов и на выходе получить достаточно чистые нуклеиновые кислоты (ДНК/РНК), которые были использованы в ПЦР.

Концентрацию выделенных ДНК измеряли спектрофотометрическим методом на NanoDrop 1000 при длине волны 260 нм. РНК в препаратах присутствовал в следовых количествах (менее 1 % по электрофоретическим данным).

ПЦР-амплификация. Реакционная смесь (20 мкл) содержала: 150 нг ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol каждого праймера.

Программа ПЦР-амплификации включала денатурацию 95 °С в течение 5 мин; 30 циклов: 95 °С – 20 секунд, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 1 минута; заключительная элонгация 10 минут при 72 °С. ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора Bio-Rad DNA Engine Tetrad2 peltier thermal cycler (Bio-Rad).

После амплификации продукты ПЦР для детекции ампликонов ДНК разделяли электрофорезом в 2 % геле агарозы, при толщине полиакриламидного геля 0,19 мм. Визуализацию полос осуществляли в УФ в присутствии бромистого этидия с помощью гель-документирующей системы производства Bio-Rad.

Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [10].

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Нуклеотидные последовательности 16S rRNA гена идентифицируемых штаммов были анализированы с помощью программного обеспечения SeqScanner v1.0 и SecMan (Applied Biosystems и Laser Gene 6). Филогенетическое древо строили с помощью программного обеспечения MEGA 3.1 [9], выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя алгоритм ClustalW, построение филогенетических деревьев проводили с использованием метода ближайших соседей (Neighbor-Joining NJ).

Результаты и обсуждение

Штаммы *Azotobacter* выделяли из 50 образцов почв г. Алматы. Ранее нами было показано, что азотфиксирующая культура *Azotobacter* обладала индикаторными свойствами на присутствие тяжелых металлов в почвах г. Алматы и была установлена степень токсичности отдельных почвенных образцов: транспортные и промышленные урбаноземы со значительным содержанием ТМ (Pb – $50,3 \pm 3,3$ мг/кг, Cd – $0,5 \pm 0,04$ мг/кг, Cu – $43,9 \pm 2,7$ мг/кг, Zn – $59,8 \pm 5,6$ мг/кг) имели минимальную численность колоний аэробных азотфиксирующих бактерий с минимальными размерами их диаметра. Количество колоний уменьшилось на 35–46 % по сравнению с фоновой почвой, взятой за городом. Полученные результаты свидетельствовали о достаточно низкой степени распространенности *Azotobacter* в городских почвах (урбаноземах), более лучшие условия существования в фоновых почвах за счет обогащения органическим субстратом способствовали увеличению популяций *Azotobacter*.

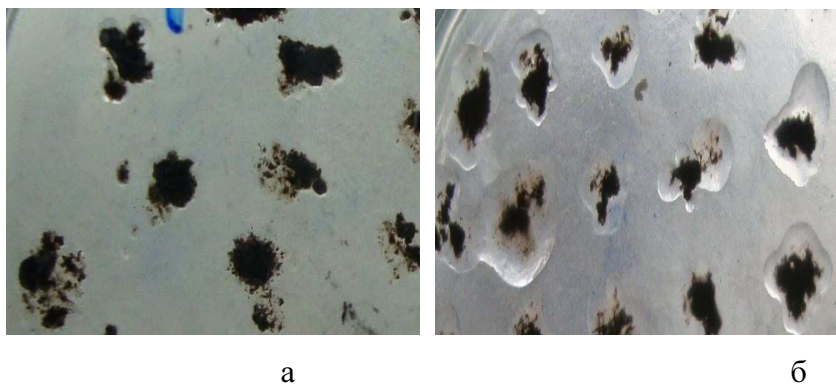


Рисунок 1. Количество КОЕ *Azotobacter* вокруг почвенных частиц урбаноземов (а) и фоновой (б)

В ходе работы были выделены 2 штамма (изолята). Первичную идентификацию бактериальных штаммов проводили на основании изучения их морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств. Установлено, что выделенные штаммы оказались мезофильными: росли при температуре 20–30°C. Предварительно они были отнесены к роду *Azotobacter*. На плотной среде Эшби штаммы 1 и 2 на 2-е сутки культивирования колонии на 2-е сутки были маленькими (0,1–0,4 мм в диаметре), на 4–6 сутки достигали 0,5–3,0 мм, форма колоний приподнятая, округлая, края ровные, гладкие, маслянисто-блестящие, беловатые, полупрозрачные, сильно ослизненные. Желатину не разжижали. Штаммы оказались не лизогенными, после хранения на плотных средах в течение 2–3 недель негативных пятен не обнаружено. При выращивании на плотных средах на 4–7 сутки обнаружен сплошной рост по штриху в виде выпуклых слизистых образований. На 5-е сутки их культивирования происходило образование коричневого пигмента. Оба штамма отличались по культуральным признакам. У культуры *Azotobacter*, шт.1 формировались колонии значительно меньшего размера, правильной округлой формы, сильно слизистые, растекающиеся колонии, форма колоний приподнятая, край и поверхность – гладкие, консистенция – клейкая. Культура *Azotobacter*, шт.2 образовывала плоские, достаточно крупные колонии неправильной округлой формы. Клетки выделяли очень мало слизи. Уже на 3-и сутки культивирования наблюдалось образование коричневого пигмента. Таким образом, комплекс фенотипических признаков по Берги [1] позволил предположить, что выделенный штамм 1 относится к виду *Azotobacter chroococcum*.

Чистую культуру выводили путем последовательных пересевов до единичной колонии в течение 7 дней при 29 °С. Полученные препараты ДНК чистой культуры двух

штаммов имели концентрацию от 34,45 до 261,27 нг/мл из 12 повторностей по 6 на каждый штамм.

Таблица 1. Концентрация ДНК культуры *Azotobacter*

№ образцов	Наименование	Концентрация, нг/мл	A260	A280	260/280
1	Шт.1/протокол 1	167,31	3,346	2,018	1,86
2	Шт.1/протокол 1	41,40	0,828	0,312	2,05
3	Шт.1/протокол 1	49,40	0,988	0,389	2,14
4	Шт.1/протокол 2	205,12	4,102	1,978	2,07
5	Шт.1/протокол 2	93,70	1,874	1,191	1,87
6	Шт.1/протокол 2	48,13	0,963	0,509	1,89
7	Шт.2/протокол 1	125,05	2,501	1,197	2,09
8	Шт.2/протокол 1	261,27	5,225	2,456	2,13
9	Шт.2/протокол 1	33,86	0,677	0,349	1,94
10	Шт.2/протокол 2	155,46	3,109	1,449	2,15
11	Шт.2/протокол 2	56,29	1,126	0,5	2,25
12	Шт.2/протокол 2	34,45	0,689	0,360	1,91

Как видно из таблицы 1, высокую концентрацию ДНК с хорошей чистотой наблюдали во всех 12 образцах при длине волны 260/280 с вариациями от 1,83 до 2,26. Для дальнейшей работы было отобрано по 3 образца каждого штамма с наибольшей концентрацией (№ 1, 4, 5 шт.1; № 6,7, 10 шт.2).

Далее провели электрофорез для детекции ДНК. На электрофореграмме отчетливо видны «бэнды» у 2 штаммов, что свидетельствовало о наличии их во всех образцах ДНК (рис.2).

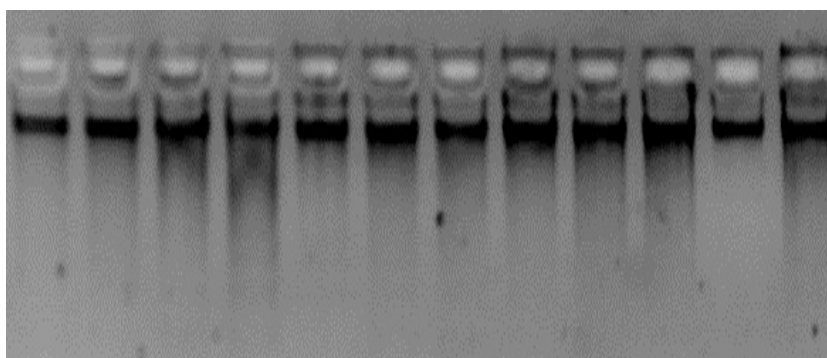


Рисунок 2. Электрофореграмма выделенных ДНК 12 образцов

После электрофореза провели ПЦР-амплификацию с универсальными праймерами 8f–5'-AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3' и 806R – 5'-ggACTACCAgggTATСТААТ-3' для увеличения количества необходимого фрагмента ДНК. Повторный электрофорез для

количественного определения фрагментов ДНК позволил нам получить участок ДНК длиной 798 п.н. (рис.3).

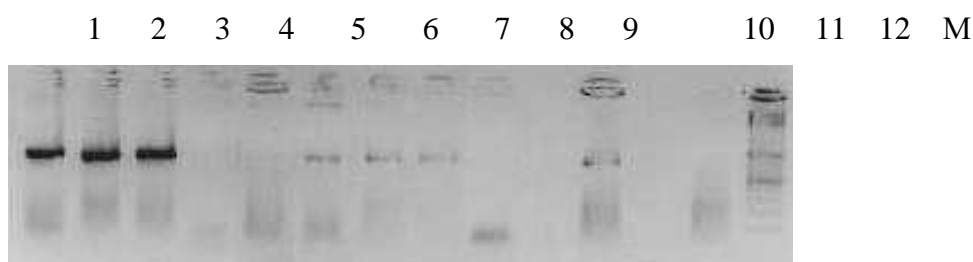


Рисунок 3. Электрофорерограмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента 16S rRNA гена ДНК

Обозначения: Образцы, нумерация согласно номера штамма; (M) маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 10000 п.н., от 100-1000 шаг 100 п.н.)

После очистки полученных фрагментов ДНК ферментативным методом провели реакцию секвенирования для прочтения нуклеотидной последовательности. В результате определили, что нуклеотидные последовательности образцов 1–3 (рис.3), относящиеся к *Azotobacter*, шт.1, имели высокую чистоту и визуализацию. Остальные образцы оказались малоинформативными.

Нуклеотидные последовательности из 1–3 образцов были объединены в общую последовательность ДНК в программном обеспечении SecMap, из которой позже были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества). Это позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью 579 п.н., которые были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Были отобраны следующие образцы ДНК *Azotobacter* 1f, 2f и 3f (forward primer). Получена 99 % гомология с депонированными последовательностями ДНК, что позволило отнести данный штамм к *Azotobacter chroococcum*.

Таким образом, молекулярно-генетическими методами было подтверждено, что *Azotobacter*, шт.1 можно отнести к *Azotobacter chroococcum* по фрагментам ДНК гена 16S rRNA размером 579 п.н., полученные методом ПЦР.

Полученные данные (в 3 повторностях) мы использовали для филогенетического анализа микроорганизмов *Azotobacter chroococcum*, шт.1. На рис. 4 представлено филогенетическое дерево, на котором исследуемые нами образцы по фрагменту 16S rRNA

объединены в один кластер *Azotobacter chroococcum*, что свидетельствует об их идентичности.

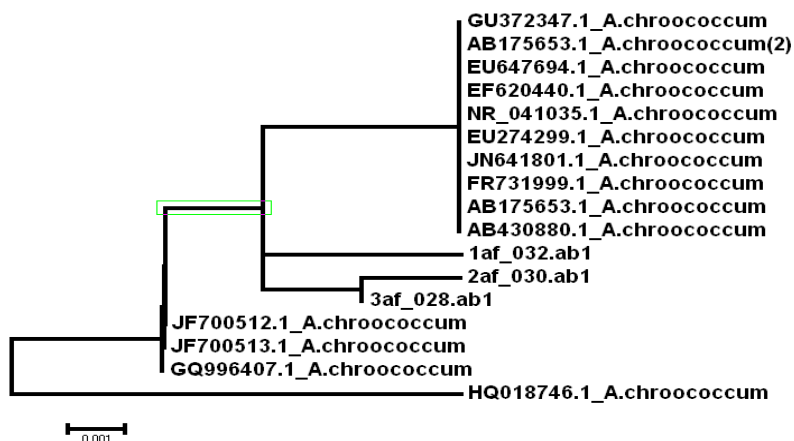


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа фрагмента гена 16S rRNA группы *Azotobacter chroococcum*

Заключение

Показана зависимость численности КОЕ азотобактера от степени загрязнения почв г. Алматы ТМ: наибольшая численность установлена для фоновой почвы (88 %), для урбаноземов она составила от 42 до 53 %. Следовательно, бактерии, относящиеся к роду *Azotobacter*, обладают индикационными свойствами по отношению к ТМ.

Нами выделено и идентифицировано 2 штамма бактерий рода *Azotobacter*. На основе анализа генетических характеристик один из них был отнесен к *Azotobacter chroococcum*. При идентификации в Gene Bank нуклеотидные последовательности 16S rRNA этого штамма имели максимальную идентичность с *Azotobacter chroococcum* (99 % гомологии).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов КазНПУ им. Абая в области фундаментальных и прикладных исследований 2011 г. (договоры № 1 и 59).

Список литературы

1. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж.Хоует. – М.: Изд-во Мир, 1980. – 495 с.
2. Марусина А.И. и др. Система олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов *nifH* различных таксономических групп прокариот // Микробиология. – 2001. – Т.70. – №1. – С. 86-91.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г.Звягинцева. – М.: МГУ, 1991. – 303 с.

4. Мынбаева Б.Н. и др. Биотестирование почв г. Алматы // Мат. межд. конф. «Актуальные проблемы микробиологии и вирусологии», 11-12 июня 2009 г. – Алматы, 2009. – С. 176-180.
5. Скворцова И.Н., Строганова М.Н., Николаева Д.А. Азотобактер в почвах города Москвы // Почвоведение. – 1997. – № 3. – С. 1-8.
6. Boom R., Sol C., Salimans M. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids//Journal of clinical microbiology. – 1990. – Vol. 3. – P. 495-503.
7. Gulyas F. et al. Analysis of soil Toxicity using *Azotobacter sp.* by soil disk method //Abstracts conf. «Proc. World». – Budapest. – 1987. – P. 753-755.
8. Kirshtein J.D., Paerl H.W., Zehr J. Amplification, cloning and sequencing of a nifH segment from aquatic microorganisms and natural communities // Apl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol.54. – P. 2645-2650.
9. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, №2. – P. 150-163.
10. Przybulewska K., Nowak A. Evaluation of sensitivity at different temperatures bacteria of the genus *Azotobacter* for the presence of soil ontaminants // Folia Univ. agr. stetin. – 2004. – № 98. – P. 143-150.
11. Werle E. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids Res. – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.
12. Zehr J., McReynolds L. Use of degenerate oligonucleotide primers for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium *Trihodesmium thiebautii* // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – Vol. 61. – P.2427-2532.

Рецензенты:

Жуматов К.Х., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией экологии вирусов Института микробиологии и вирусологии КН МОН РК, г. Алматы.

Кушугулова А.Р., д.м.н., ст. науч. сотр. Департамента трансляционной медицины, долголетия и глобального здоровья Университета им. Н.А. Назарбаева, г. Астана.