

УДК 578.81

Ю. Ш. Шафеева, С. Н. Янов

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Цианобактерии – это группа грамотрицательных кислородных микроорганизмов, представители которой характеризуются большим разнообразием морфологических форм, способов деления, а также сложным клеточным циклом. Цианобактерии сочетают прокариотическое строение клетки и в тоже время способность продуцировать кислород в процессе фотосинтеза, что характерно преимущественно для различных групп водорослей и высших растений.

При определенных условиях возможен переход цианобактерий к бескислородному фотосинтезу, с использованием в качестве экзогенных доноров электронов восстановленных соединений серы (H_2S , $Na_2S_2O_3$), молекулярного водорода и ряда органических соединений серы (сахара, кислоты).

Повышенный интерес микробиологов и биотехнологов к этим бактериям вызвал необходимость разработки новых методов их типирования на основе молекулярно-генетических методов. В статье представлены результаты работы по изучению генетического разнообразия цианобактерий, выделенных из водоемов г. Кирова с использованием полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: цианобактерии, типирование, полимеразная цепная реакция.

Цианобактерии играют важную роль в поддержании глобального баланса углерода и азота. Данные микроорганизмы способны к осуществлению фотосинтеза с выделением молекулярного кислорода, а некоторые представители являются азотфиксаторами. Благодаря этому цианобактерии широко используются в качестве модельных организмов для изучения фундаментальных биологических процессов, а именно: фотосинтеза и его

генетического контроля; клеточной дифференцировки и фиксации азота; метаболизма азота, углерода и водорода и молекулярной эволюции [1].

Перспективно применение цианобактерий и в биотехнологии, например, для повышения плодородия почв на рисовых полях, в качестве биоиндикаторов токсичности почв, а также загрязненности окружающей среды солями тяжелых металлов, таких как ртуть, кадмий, медь. Также обнаружена способность чистых и смешанных культур цианобактерий участвовать в биологической очистке ванадийсодержащих стоков [2]. Ввиду большого разнообразия цианобактерий возникают сложности их типирования, т.е. соотнесения выделенных изолятов к определенному виду. Поэтому в настоящее время актуальным вопросом является разработка методов идентификации цианобактерий.

В настоящее время большинство ученых сходятся во мнении, что одних данных, полученных с использованием световой микроскопии, недостаточно для определения видового состава сообществ цианобактерий [3, 4]. Многие виды не имеют отличительных особенностей, видимых в световой, а порой и в электронный микроскопы, к тому же некоторые морфологические характеристики являются приспособительными и зависят от условий окружающей среды, а, следовательно, могут быть достаточно переменными [6]. Например, слизь, соединяющие тяжи, одиночный или колониальный образ жизни, формирование игл у видов *Chlorella*-клады являются адаптивным ответом на факторы окружающей среды, такие как эндосимбиотическое или наземное существование [5]. В настоящее время для точной таксономической идентификации цианобактерий необходимо использовать сведения об ультраструктуре, такие как расположение тилакоидов и строение клеточной стенки, давно считающиеся важными диагностическими признаками [3]. Однако и эти признаки не дают достоверного результата. Поэтому для оценки разнообразия цианобактерий в водных и наземных экосистемах, интерпретации их экологии и биогеографии требуется подход, учитывающий

морфологические, ультраструктурные, биохимические, и молекулярно-генетические, физиологические и экологические данные.

Трудности в определении и уточнении таксономического статуса организмов могут быть решены с помощью привлечения различных молекулярных методов идентификации, основанных на анализе последовательностей ДНК. Эти методы имеют теоретическое обоснование в рамках теории нейтральной эволюции, согласно которой большинство из замен в ДНК и белках эффективно нейтральны, и по этой причине неизбежно и по определенными законам накапливаются при расхождении видов. В результате этого представители одного вида несут определенную последовательность ДНК, отличную от представителей других видов. Теоретические предсказания закономерностей молекулярной эволюции достаточно хорошо согласуются с наблюдениями на реальных биологических объектах [6].

Для таксономической идентификации цианобактерий и определения их филогенетических взаимоотношений используют целый ряд молекулярных маркеров. Широкое распространение получил метод сравнения последовательностей фрагментов генов 16S рРНК бактерий. Однако, несмотря на то, что ген 16S рРНК широко используется в таксономических и филогенетических исследованиях всех бактериальных фил в качестве стандартного маркера, благодаря своей консервативной природе он не всегда обеспечивает адекватную идентификацию цианобактерий даже тогда, когда виды физиологически различны.

В данный момент для типирования цианобактерий широко используется метод, основанный на поиске в геноме данных организмов повторяющихся последовательностей. В качестве таких последовательностей используются тандемно повторяющиеся повторы (STRR последовательности) и высоко повторяющиеся палиндромные последовательности (НПР последовательности). Широкое распространение и достаточная консервативность повторяющихся

последовательностей позволяет использовать их в качестве метода как для идентификации видов или штаммов, так и для анализа биоразнообразия [7].

Цель нашего исследования – изучить генетическое разнообразие цианобактерий в водоёмах г. Кирова с использованием полимеразной цепной реакции.

Для типирования цианобактерий с помощью метода полимеразной цепной реакции были получены чистые культуры данных микроорганизмов. Для этого были взяты пробы воды из различных водоемов г. Кирова.

Для получения накопительной культуры 1,0 мл отобранной пробы поместили пробирку с 5 мл жидкой питательной среды Громова № 6 (г/л): KNO_3 1,0, CaCl_2 – 0,15, K_2HPO_4 – 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, NaHCO_3 – 0,2, раствор микроэлементов – 1 мл: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22 г/л, MnSO_4 – 1,81 г/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,079 г/л.

Культивирование проводили в люминостане при температуре 25°C в течение 28 дней. По окончании времени культивирования наблюдали образование крупных агрегировавших колоний, состоящих из разных родов сине-зеленых водорослей.

Для выделения альгологически чистых культур кусочки пленок цианобактериальных колоний пересевали в жидкую среду Громова № 6, содержащую в своем составе 1% детергента TWEEN, который препятствовал адгезии культур разных цианобактерий между собой. Пересев путем многократных последовательных разведений осуществляли через каждые 14 дней.

Идентификацию чистых культур проводили с помощью светового микроскопа и определителя цианобактерий А.А. Еленкина. В результате чего были обнаружены цианобактерии родов: *Nostoc* и *Oscillatoria*.

Выделение ДНК из полученных культур осуществляли по методике Зинченко В.В., МГУ: 50 мл культуры с $\text{OD}_{730}=1,2-2$ центрифугировали в режиме 3000 об/мин, 4 °C, 10 минут, собирали клетки в микропробирки типа эппендорф

и промывали в 1,5 мл буфера Трис/ЭДТА. Затем проводили центрифугирование в режиме 15000 об/мин, при 4 °С, 1 минуту, сливали супернатант, добавляли 270 мкл STET и суспензировали, после чего добавляли 15 мкл хлороформа и перемешивали 3 минуты. К полученному раствору добавляли 30 мкл лизоцима (концентрация 50 мг/мл), выдерживали при температуре 37 °С в течение 30 минут, затем вносили 100 мкл 10% SDS и инкубировали при температуре 65 °С в течение 40 минут, добавляли 100 мкл 5M NaCl и выдерживали при температуре 65 °С в течение 20 минут. Для увеличения объема добавляли 200 мкл 1M NaCl, после чего вносили 500-600 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивали 3 минуты. Провели центрифугирование в режиме 15000 об/мин, при комнатной температуре в течение 10 минут. Экстракцию повторяли 3 раза. Для того чтобы осадить ДНК, к водной фазе добавляли 0,5 мл (1 объем) изопропанола и выдерживали при комнатной температуре в течение 15-20 минут. После этого центрифугировали в режиме 15000 об/мин, 4 °С, 10 минут, осадок промывали 70% этанолом и растворяли в 50 мкл воды [8].

Для выявления генетических особенностей в структуре ДНК выделенных штаммов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались праймеры гомологичные палиндромам, которые наиболее часто встречаются в геномах цианобактерий *Nostoc* sp. и *Oscillatoria* sp. Палиндромы были найдены с использованием компьютерной программы «PalindromeSearch» Кузьмина А. А. Два из выявленных палиндромов, имеющих наибольшее число копий в геноме цианобактерий, использовались для подбора праймеров с помощью программы «Oligo 6» и типирования штаммов цианобактерий. В результате проведенных исследований были выявлены различия длин амплифицированных фрагментов при использовании одного и того же праймера.

Таким образом, метод изучения полиморфизма длин амплифицированных фрагментов при анализе ДНК цианобактерий позволяет выявить генетические различия не только между видами, но и между штаммами одного вида.

Список литературы

1. *Кокшарова О. А.* Цианобактерии: перспективные объекты научного исследования и биотехнологии // Успехи современной биологии . 2008. Т. 128. № 1. С. 3–20.
2. *Саванина Я. В., Лебедева А. Ф.* Биологическая очистка ванадийсодержащих стоков с использованием чистых и смешанных культур цианобактерий // Электрометаллургия. 2000. № 4. С. 19–23.
3. *Сороковикова Е. Г.* Идентификация двух штаммов цианобактерий из Котельниковского термального источника Байкальской рифтовой зоны / *Е. Г. Сороковикова, И. В. Тихонова, О. И. Белых, И. В. Клименков Е. В., Лихошвай* // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 413–420.
4. *Thajuddin N.* Morphological and genetic diversity of symbiotic cyanobacteria from cycads / *N. Thajuddin, G. Muralitharan, M. Sundaramoorthy, R. Ramamoorthy, S. Ramachandran, M. A. Akbarsha & Gunasekaran* // Journal of basic microbiology. 2010. V. 50. № 3. P. 254–265.
5. *Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L.* Generic concept in Chlorella-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Plant Biol. 2010. V. 12. № 3. P. 545–553.
6. *Темралеева А. Д., Минчева Е. В., Букин Ю. С., Андреева А. М.* Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома : Костром. печат. дом, 2014. 215 с.
7. *Shukla E., Singh S. S., Mishr A. K.* Fingerprinting and Phylogeny of Some Heterocystous Cyanobacteria Using Short Tandemly Repeated Repetitive and Highly Iterated Palindrome Sequences // Microbiology. 2013. V. 82. № 6. P. 801–808.
8. Выделение геномной ДНК из цианобактерий. URL: https://molbiol.ru/protocol/24_01.html (дата обращения: 12.01.2017).

ШАФЕЕВА Юлия Шамильевна – студентка Института биологии и биотехнологии, кафедра Микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: Julia_shafeeva@rambler.ru

ЯНОВ Сергей Николаевич – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: Yanov1947@mail.ru