Известия Тульского государственного университета
Естественные науки. 2013. Вып. 2. Ч.1. С. 298–305

Биология

УДК 546.6:574.4

# Изучение особенностей адсорбции микроорганизмов из серой лесной почвы на магнетите методом полиморфизма длин терминальных рестрикционных фрагментов *

Л. В. Переломов, Н. Л. Лагунова, И. В. Переломова,
К. В. Сюндюкова, М. Шлотер

*Аннотация.* Проведена количественная оценка адсорбции микроорганизмов, выделенных из серой лесной почвы, на магнетите на основе изучения концентрации ДНК в равновесном растворе и на поверхности минерала. Методом полиморфизма длин терминальных рестрикционных фрагментов (T-RFLP) изучена структура сообществ адсорбированных и неадсорбированных микроорганизмов и показан специфический характер их взаимодействия с магнетитом.

*Ключевые слова*: полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов, адсорбция, микроорганизмы, магнетит.

## Введение

Взаимодействия минералов железа, микроорганизмов и нутриентов в почвах оказывают огромное влияние на процессы, определяющие качество окружающей среды и нормальное функционирование экосистем [1].

Минеральный состав почв является одной из важных частей экологии почвенных микроорганизмов. Взаимодействие минералов с микроорганизмами влияет на химическую и метаболическую трансформацию природных и антропогенных органических и неорганических веществ, в том числе соединений микроэлементов. С другой стороны, микроорганизмы и их метаболиты оказывают воздействие на выветривание минералов, образование их агрегатов, изменяют поверхностные свойства, в том числе их реактивность по отношению к нутриентам и загрязнителям [2].

* Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП МОН РФ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (лот 2012-1.2.2-12-000-1013, соглашение № 14.B37.21.0197).

Адсорбция бактерий на минералах зависит от химического состава раствора, ионной силы, pH, минералогии и концентрации бактерий [3].

Относительно мало известно о специфическом и неспецифическом характере взаимодействия между минералами железа и микроорганизмами в почвах. Целью нашего исследования было определить возможные структурные изменения в микробном сообществе при адсорбции микроорганизмов на магнетите с использованием метода полиморфизма длин терминальных рестрикционных фрагментов (T-RFLP)

Метод T-RFLP (англ. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) впервые описан Liu с соавторами 1997 году [4]. Метод основан на реакции амплификации целевого гена с определенным набором праймеров, меченных флуоресцентной меткой, и гидролизе полученного продукта с помощью ферментов рестрикции. Каждый вид микроорганизмов имеет уникальную нуклеотидную последовательность гена 16S рРНК, тем самым в результате гидролиза образуются фрагменты различной длинны, характерной для конкретного микроорганизма. Определением относительного количества концевых рестрикционных фрагментов различной длины позволяет определить относительные количества тех или иных микроорганизмов в исследуемом образце. В отличие от классических методов микробиологии данный прием позволяет анализировать практически все микроорганизмы, присутствующие в экосистеме.

## 1. Объекты и методы

**1.1. Почвенные образцы.** Смешанный образец серой лесной почвы был отобран под широколиственным лесом в окрестностях Ясной Поляны (54° 4’ 58"N, 37° 32’ 23"E). Физические и химические свойства почв показаны в табл. 1.

Таблица 1

Свойства почв, из которых были экстрагированы клетки микроорганизмов для эксперимента

| **Почвенные свойства** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Сорг, % | $pH_{(H2O)}$ | $pH_{(KCl)}$ | $P_2O_5$ мг/100 г | $K_2O$ мг/100 г | Мг-экв/100 г | | |
| | | | | | $Ca^{2+}$ | $Mg^{2+}$ | $K^+$ | $Na^+$ |
| 3,18 | 5,37 | 4,62 | 5,23 | 12,33 | 12,30 | 1,30 | 0,44 | 0,09 |
| **Содержание гранулометрических фракций, %** | | | | | | | |
| Фракция, мм | | | | | | | |
| 1-0,25 | 0,25-0,05 | 0,05-0,010 | 0,01-0,005 | 0,005-0,001 | <0,001 | >0,01 | <0,01 |
| 1,20 | 13,92 | 53,28 | 7,68 | 10,12 | 13,80 | 68,40 | 31,60 |

**1.2. Экстракция клеток.** Для экстракции микробных клеток с поверхности почвенных частиц была использована следующая процедура. К 1 г почвы в пластиковых пробирках было добавлено 20 стеклянных шариков (диаметром 2–3 мм) и 0,4 г ионообменной смолы Chelex 100. Затем в пробирки было добавлен 3 мл 1% холата натрия, после чего их встряхивали при температуре 4°C в течение 2 часов. По окончании встряхивания суспензию центрифугировали при 2000 оборотов/мин. Отобранный супернатант центрифугировали при 14000 оборотов/мин в течение 10 минут, после чего полученный осадок был тщательно ресуспендирован в 1,5 мл 0,9% NaCl для последующего использования в сорбционных экспериментах.

**1.3. Сорбционный эксперимент.** 0,01 г магнетита было добавлено к 1,5 мл суспензии клеток в NaCl и помещено в шейкер. После 1, 4 и 24 часов взаимодействия минерал с адсорбированными микроорганизмами и микроорганизмы в растворе были разделены при помощи лабораторной магнитной установки (DynaMag) в течение 5 минут. Для анализа структуры неадсорбированного микробного сообщества использовали 1,5 мл отобранной суспензии. Частицы магнетита были мягко промыты 3 раза 2 мл физиологического раствора (вне магнитной установки), после чего каждый раз проводилось разделение суспензии микробов и минерала при помощи магнита. Полученная твёрдая фаза использовались для последующего анализа структуры сообщества адсорбированных микроорганизмов. Отобранная надосадочная суспензия и частицы минерала в физиологическом растворе центрифугировали при 8000 оборотов/мин в течение 15 минут и использовалась для последующей экстракции ДНК.

**1.4. Экстракция ДНК.** Экстракция ДНК была проведена с использованием аналитического набора FatsDNA Spin kit для почв (MP Biomedicals, ФРГ). Количество и качество экстрагированных ДНК проводили при помощи спектрофотометра (Nanodrop, PeqLab, ФРГ).

**1.5. Варианты эксперимента с внесением доступных форм N и C.** Эксперимент был проведён в трёх вариантах: 0 — исходная почва без добавок; A — добавление 1 мл 0,5% экстракта дрожжей к клеткам, экстрагированным ионообменной смолой и холатом Na, с последующей инкубацией в течение 19 часов; B — предварительная инкубация исходной почвы с 1 мл 0,5% экстракта дрожжей в течение 19 часов.

**1.6. Микробное разнообразие.** Микробное разнообразие было исследовано методом полиморфизма длин терминальных рестрикционных фрагментов (T-RFLP) ключевых бактериальных 16S рРНК генов [5]. Для амплификации были использованы пары B27f [6] и 1401r [7]. Форвардный праймер был маркирован 6-карбоксифлуоресцеином. ПЦР была выполнена в 50 мкл (конечный объём) смеси, включающей ПЦР буфер, 2 ммоль $MgCl_2$ (Invitrogen, USA), 0,2 ммоль дНТФ (Fermentas, Germany), 0,3% БСА, 5% ДМСО(Sigma-Aldrich, Germany), 0.2 пмоль каждого праймера, 0,025 Ед/мкл Taq полимеразы (Invitrogen, USA) и 20-40 нг эталона. Амплификация

происходила при следующих условиях: исходная денатурация при 95°C в течение 5 минут, затем следовали 35 циклов денатурации по 1 минуте при 94°C; отжиг при 57°C в течение 1 минуты и элонгация при 72°C в течение 1,5 минут. Окончательное удлинение происходило при 72 ° C в течение 10 мин. Продукты ПЦР очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, ФРГ) и затем расщепляли рестриктазой *MspI* (New England Biolabs, ФРГ) соответствии с протоколом производителя. Рестриктазы были выбраны с использованием программы REPK (Restriction Endonuclease Picker [8]. Полученные ампликоны (50 нг) были обессолены и очищены с использованием набора MiniElute Reaction Cleanup Kit (Quiagen, ФРГ). Затем один микролитр ампликона был смешан с 13 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, ФРГ). Один мкл смешивают с 13 мкл Привет-ди-формамид (Applied Biosystems, ФРГ). Электрофорез проводили следующих условиях: времени впрыска — 10 с, напряжение при впрыске — 2 кВ, рабочее напряжение — 7 кВ, температура — 66°C, время анализа — 63 мин. Программный пакет GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems, Германия) был использован для анализа электрофореграммы.

Для статистической оценки данных был проведён межгрупповой анализ, основанный на соответствии [9] (Culhane et al., 2002). Анализ проводился с пакетом ADE4 [10] (Chessel соавт., 2004) в программной среде R (www.r-project.org).

## 2. Результаты и их обсуждение

**2.1. Адсорбция микроорганизмов на магнетите.** Адсорбция микроорганизмов на магнетите рассчитывалась по концентрации ДНК. Средние концентрации нуклеиновых кислот в исходной суспензии клеток, равновесном растворе и на поверхности магнетита показаны в табл. 2.

Добавление дрожжевого экстракта к экстрагированным клеткам (вариант А) увеличивало средние концентрации ДНК в исходной суспензии клеток, свидетельствуя об увеличении количества микроорганизмов в присутствии доступных форм азота и углерода. Наблюдается увеличение концентрации ДНК на поверхности магнетита со временем (в почве и варианте В). Исходя из практически не изменяющихся концентраций ДНК в равновесном растворе со временем, можно говорить об увеличении силы связи между микроорганизмами и магнетитом в этих вариантах при увеличении времени взаимодействия. В тоже время в варианте А концентрации ДНК как в равновесном растворе, так и на поверхности магнетита со временем не изменяется, что свидетельствует об исходной прочной фиксации микроорганизмов на поверхности магнетита

**2.2. Анализ профилей рестрикционных фрагментов.** Полученные профили полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов в каждом из вариантов эксперимента (рис. 1 и 2) характеризует общее разнообразие прокариотических организмов. Результаты показывают,

Таблица 2

Концентрации ДНК в ходе эксперимента (средние значения и стандартные отклонения), нг/мкл

| Время | Вариант | | |
|---|---|---|---|
| | 0 | A | B |
| | 302± 69 (почва) | 386,5± 55,9 (суспензия) | 295,4± 7,5 (почва) |
| Исходная суспензия клеток (**SO**) | | | |
| 1 час | **276,3±69,4** | **355,4±83,2** | **272,6±50,2** |
| 4 часа | **273,5±16,1** | **357,5±96,8** | **251,5±17,7** |
| 24 часа | **285,9±21,2** | **272,7±61,4** | **273,2+124,9** |
| Равновесный раствор (**SL**) | | | |
| 1 час | 16,1± 3,5 | 220,7± 48,3 | 22,5± 3,9 |
| 4 часа | 25,0± 2,1 | 158± 21,2 | 12,9± 3,3 |
| 24 часа | 20,3± 3,2 | 163,2± 23,7 | 19,6± 4,2 |
| Поверхность магнетита (**Fe**) | | | |
| 1 час | 55,3± 13,7 | 116,1± 34,3 | 91,1± 40,2 |
| 4 часа | 104,7± 4,0 | 101,0± 9,7 | 103,7± 30,7 |
| 24 часа | 148,9± 30,3 | 104,6± 18,5 | 163,6± 35,6 |
| Суммарно в равновесном растворе и на поверхности магнетита (% от исходной суспензии) | | | |
| 1 час | 71,4 (25,8%) | 336,8 (94,8%) | 113,6 (41,7%) |
| 4 часа | 129,7 (47,4%) | 259,0 (**72,4%**) | 116,9 (46,5 %) |
| 24 часа | 169,2 (59,2%) | 267,8 (98,2%) | 183,2 (67,1%) |

что большее разнообразие (96 различных фрагментов) наблюдается в варианте B с внесением доступных нутриентов в почву, нежели чем в варианте A при добавлении азота и углерода к отделённым от почвенных частиц микроорганизмам (57 фрагментов). Кроме того, в экспериментальных вариантах доминирующее положение занимают разные группы микроорганизмов.

Для варианта B (рис. 2) продолжительность взаимодействия с магнетитом оказывает значительное влияние на микробное разнообразие. Перед экспериментов в исходной суспензии отделённых от почвы клеток отмечены 96 различных терминальных рестрикционных фрагмента. После 24 часов взаимодействия с магнетитом в суспензии происходит уменьшение разнообразия и находится только 44 фрагмента. При этом доминантная группа микроорганизмов остаётся прежней.

Анализ профилей показывает, что существуют значимые различия в профилях фрагментов между микроорганизмами в исходной суспензии и микроорганизмами, адсорбированными на магнетите, независимо от времени взаимодействия, в варианте A (рис. 1).

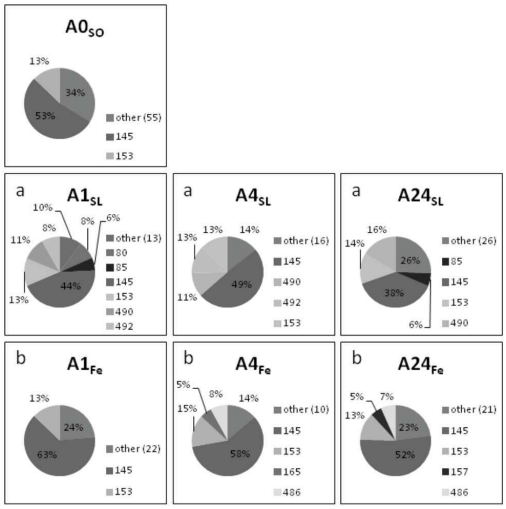



Рис. 1. Профили полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов (вариант А)

При внесении доступных нутриентов в почву для стимулирования микробиологической активности (вариант В) наблюдаются статистически значимые различия между группами микроорганизмов, адсорбированных на магнетите и находящимися в равновесном растворе для всех временных точек, кроме 1 часа взаимодействия. По сравнению с исходной суспензией подобное различие проявляется на поверхности магнетита только через 24 часа взаимодействия (рис. 2).

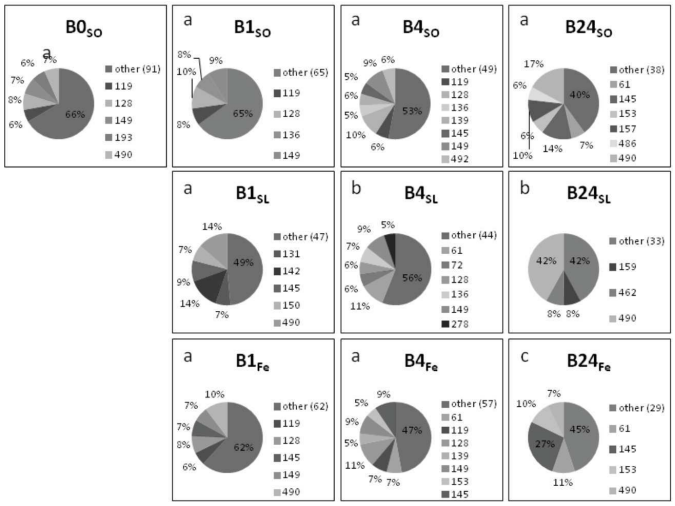



Рис. 2. Профили полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов (вариант В)

Таким образом, проявляется селективность в адсорбции отдельных групп микроорганизмов на железистом минерале, однако особенности этого поглощения определяются условиями взаимодействия.

## Список литературы

1. *Huang P.M.* Foreseeable impacts of soil mineral-organic component-microorganism interactions on society: ecosystem health. In: Developments in Soil Science. Dynamics, Mobility and Transformation of Pollutants and Nutrients. Elsevier, 2002. V. 28 A. P. 1–36.
2. *Konhauser K.O., Urrutia M.M.* Bacterial clay authigenesis: a common biogeochemical process // Chemical Geology. 1999. V. 161. P. 399–413.
3. Bacteria adhesion: A physicochemical approach / M.C.C. van Losdrecht [et al.] // Microbial Ecology. 1989. V. 17. P. 1–15.
4. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. / W.T. Liu [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 4516–4522.
5. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities / B.G. Clement [et al.] // J. of Microbiological Methods. 1998. V. 31. P. 135–142.
6. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand / M.C. Portillo [et al.] // Extremophiles. 2009. V. 13. P. 321–331.
7. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen / J.E. Edwards [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. 2007. V. 62. P. 323–335.
8. *Collins R.E., Rocap G.* REPK: an analytical web server to select restriction endonucleases for terminal restriction fragment length polymorphism analysis // Nucleic Acids Research. 2007. V. 35. P. W58–W62.
9. Between-group analysis of microarray data / A.C. Gulhane [et al.] // Bioinformatics. 2002. V. 18. P. 1600–1608.
10. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade4 package-I- One-table methods // R News. 2004. V. 4. P. 5–10.

*Переломов Леонид Викторович* (perelomov@rambler.ru), к.б.н., доцент, кафедра медико-биологических дисциплин, Тульский государственный университет.

*Лагунова Наталья Леонидовна*, к.б.н., доцент, кафедра химии, Тульский государственный университет.

*Переломова Ирина Владимировна*, к.б.н., доцент, кафедра медико-биологических дисциплин, Тульский государственный университет.

*Сюндюкова Кристина Викторовна*, аспирант, кафедра биотехнологии, Тульский государственный университет.

*Шлотер Микаэл*, профессор, Гельмгольц Центр Мюнхена, Германский исследовательский центр здоровья окружающей среды, Мюнхен, ФРГ.

## Study of adsorption characteristics of microorganisms from gray forest soil on magnetite by terminal restriction fragment length polymorphism method

L. V. Perelomov, N. L. Lagunova, I. V. Perelomova, K. V. Syundyukova, M. Schloter

*Abstract.* A quantitative assessment of adsorption of microorganisms isolated from the haplic luvisol by magnetite based on studying of DNA concentration in the equilibrium solution and on the mineral surface was carried out. T-RFLP method to study the structure of adsorbed and unadsorbed microorganism communities was used and a specific nature of their interaction with magnetite was shown.

*Keywords*: terminal restriction fragment length polymorphism, adsorption, microorganisms, magnetite.

*Perelomov Leonid* (perelomov@rambler.ru), candidate of biological sciences, associate professor, department of biology and medicine, Tula State University.

*Lagunova Natalia*, candidate of biological sciences, associate professor, department of chemistry, Tula State University.

*Perelomova Irina*, candidate of biological sciences, associate professor, department of biology and medicine, Tula State University.

*Syundyukova Kristina*, postgraduate student, Department of biotechnology, Tula State University.

*Schloter Michael*, professor, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Munich, Germany.

*Поступила 20.06.2013*