



Биология

Наука XXI века

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ

Виктория Александровна Яценко

Принял(а) участие в работе 23-й
Международной Пущинской школе-
конференции «Биология - наука XXI века»
с докладом «АНАЛИЗ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТА-
ВА ЭУБАКТЕРИАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТЫ МЕЗОФИЛЬ-
НОГО СООБЩЕСТВА ДВУХРЕАКТОРНОЙ БИОГАЗО-
ВОЙ СТАНЦИИ» на секции «Микробиология и вирусоло-
гия»

15-19 апреля 2019 г.

Пущино, Россия

Секретарь оргкомитета



Председатель оргкомитета

Фахранурова Л.И.

Хаустов С.А.



нефтепроявлений. Хроматографический анализ показал корреляцию между количественным содержанием УВОМ в образце и концентрациями компонентов нефти, отраженных в хроматографическом профиле нефтесодержащей пробы.

АНАЛИЗ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЭУБАКТЕРИАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТЫ МЕЗОФИЛЬНОГО СООБЩЕСТВА ДВУХРЕАКТОРНОЙ БИОГАЗОВОЙ СТАНЦИИ

Яценко В.А.¹, Клюева В.В.¹, Ходжаев Ю.Р.¹, Бояршин К.С.¹, Батлущая И.В.¹

¹ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

viktori-y-99@mail.ru

В условиях сложившейся экологической ситуации актуальным стало производство биогаза, в основе которого лежит технология анаэробного сбраживания субстратов с помощью метаногенных микробных сообществ. Такие сообщества складываются из архейной и бактериальной компонент. Изучению таксономического состава метаногенных архей в биогазовых установках посвящено значительное количество работ. При этом, бактериальная компонента играет не менее значимую роль, обеспечивая архей субстратами для выработки метана посредством синтрофных экологических связей в сообществе.

Задачей данной работы был анализ таксономического состава эубактерий в микробном сообществе биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» на севере Белгородской области. Сбраживаемая масса включала свиноводческие навозные стоки, кукурузный силос, мясные отходы, сахаросвекольный жом и др. Сбраживание велось при 39 °С.

На основании литературных данных были использованы таксон-специфические пары праймеров для детекции микроорганизмов, относящихся к типам Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, candidatus Saccharibacteria, Verrucomicrobia, Tenericutes, и трём классам типа Proteobacteria – Beta-, Gamma- и Epsilonproteobacteria.

Биогазовая установка станции «Лучки» включает две зоны: зону первичного сбраживания и зону дображивания. Анализ таксономической структуры бактериальной компоненты сообщества в первой зоне показал следующее содержание различных таксонов: Firmicutes 60%, Bacteroidetes 14%, Gammaproteobacteria 9,1%, candidatus Saccharibacteria 0,36%, Betaproteobacteria 0,13%, Actinobacteria 0,01%, и 16% остальных. Во второй зоне, в период наиболее интенсивного метаногенеза, доминирование типа Firmicutes стало ещё более выраженным и составило 78%, тогда как содержание Bacteroidetes составило 12%, Gammaproteobacteria – 2,8%, Betaproteobacteria – 0,02% и 7,1% других. Типы candidatus Sackharibacteria и Actinobacteria в зоне дображивания не детектируются.

Таким образом, на поздней стадии сбраживания разнообразие эубактерий в биогазовой установке снижается, что отражает значительную степень истощения субстратов, перерабатываемых бактериальной микрофлорой и сужение доступных ей экологических ниш.

способность к обесцвечиванию красителя *A. brasilense* Sp245 и SR80, если культивирование Sp245 в присутствии MgSO₄ повышало эффективность биodeградации на 10%, то для штамма SR80 отмечалось снижение степени деструкции на 18-36% в зависимости от концентрации.

Было проведено исследование, влияния нескольких ионов металлов, обычно встречающихся в текстильных сточных водах, на эффективность биodeградации азоспириллами малахитового зеленого.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-00008 мол_а.

Таксономическая структура бактериальной компоненты микробного сообщества промышленной биогазовой установки на двух стадиях сбраживания сложного субстрата

Яценко В.А.¹, Ключева В.В.¹, Ходжаев Ю.Р.¹, Бояршин К.С.¹, Мейлах И.К.^{2,3}, Бредихин В.П.^{2,3}, Батлуцкая И.В.¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»)

²Общество с ограниченной ответственностью «АльтЭнерго»

³Акционерное общество «Белгородский институт Альтернативной энергетики», г. Белгород; kboyarshin@mail.ru

Производство биогаза получает всё большее распространение в регионах страны, где активно функционирует агропромышленный комплекс и производится большое количество органических отходов и субпродуктов. В его основе лежит технология анаэробного сбраживания субстратов, ключевую роль в которой играют метаногенные микробные сообщества, спонтанно складывающиеся в рабочих емкостях биогазовой установки на основе микрофлоры поступающего сырья.

Метаногенез осуществляется археями, находящимися в отношениях синтрофии с различными таксонами эубактерий, перерабатывающих исходные составляющие субстрата [Enzmann 2018]. Структура бактериальной компоненты сообщества наиболее разнообразна – скажем, в подробном исследовании мезофильного метаногенного сообщества, сбраживающего свиные навозные стоки, было показано преобладание таксономического разнообразия эубактерий над разнообразием архей в 3-7 раз [Pampillón-González 2017]. Разнообразие сбраживаемых субстратов существенно сказывается и на таксономической структуре эубактериальной компоненты сообществ [Sun 2016].

В настоящей работе мы анализировали таксономический состав эубактерий в метаногенном сообществе биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» на севере Белгородской области. Её биогазовая установка включает две зоны, пространственно разделённые и обеспечивающие раздельное прохождение двух различных стадий сбраживания субстратов. Образцы сбраживаемой массы из обеих зон были отобраны в сентябре 2017 г. в количестве по 0,5 л и хранились в замороженном состоянии при -20 °С. Сбраживаемая масса (смесь субстратов в процессе их ферментации) включала свиноводческие навозные стоки, кукурузный силос, мясные отходы, сахаросвекольный жом и другие органические компоненты в измельчённом состоянии. Суммарную ДНК выделяли при помощи набора «FastDNA Spin kit for Soil» фирмы «MPbio».

На основании литературных данных [Yang 2015] нами были использованы таксон-специфические пары праймеров для детекции микроорганизмов, относящихся к типам *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deferribacteres*, *candidatus Saccharibacteria*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, и трём классам типа *Proteobacteria* – *Beta*-, *Gamma*-, *Epsilonproteobacteria*. Для проведения ПЦР РВ использовали реакционную смесь

производства ЗАО «Синтол» (лот М-427). Смеси объемом по 25 мкл содержали по 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, по 7,5 мкл растворов праймеров, добавляемых до конечной концентрации 0,33 пмоль/мкл каждого, 2 мкл препарата ДНК-матрицы и 5,5 мкл деионизированной воды. Таким образом, реакции велись с использованием рекомбинантной ДНК-полимеразы SynTaq при pH 8,8, в присутствии 2,5 mM MgCl₂, с детекцией продукта по флуоресценции красителя SYBR Green I. Программа термоциклера для ПЦР РВ «CFX96 Touch» фирмы «Bio-Rad» содержала этап плавления ДНК и активации ДНК-полимеразы при температуре 96 °С продолжительностью 5 мин. За ним следовали 40 циклов амплификации, включавшие по три этапа продолжительностью 20 сек: плавления при 96 °С, отжига праймеров при 60 °С и элонгации растущей цепи при 72 °С. Обсчёт полученных данных проводили по методу, предложенному в литературном источнике [Vacchetti De Gregoris 2011], по формуле

$$X = \frac{A_{(Uni)}^{Cq(Uni)}}{A_{(X)}^{Cq(X)}} \cdot 100\%$$

где X – процентная доля ДНК определённого таксона бактерий среди всей бактериальной ДНК, A – факторы амплификации для универсальной пары праймеров (Uni), специфичной к ДНК царства бактерии, и пары праймеров, специфичной к ДНК данного таксона (X), Cq – число циклов амплификации, необходимое для достижения порогового значения, установленного программным обеспечением амплификатора в том и другом случае. Полученные результаты представлены в таблице:

Таксон микроорганизмов	Ранг таксона	% в сообществе	
		Ранняя стадия	Поздняя стадия
<i>Firmicutes</i>	тип	60	78
<i>Bacteroidetes</i>	тип	14	12
<i>Gammaproteobacteria</i>	класс	9,1	2,8
<i>Sacharibacteria</i>	тип	0,36	-
<i>Betaproteobacteria</i>	класс	0,13	0,02
<i>Actinobacteria</i>	тип	0,01	-
Остальные	-	16	7,1
Всего	-	100	100

Согласно представленным данным, среди зубактериальной компоненты сообщества наблюдается выраженное доминирование типа *Firmicutes*. Этот таксон, в частности, включает молочнокислых бактерий (отряд *Lactobacillales*), входящих в микрофлору кукурузного силоса и навозных стоков – основных субстратов процесса. На поздней стадии сбраживания, в период усиления роли метаногенных архей, разнообразие зубактерий снижается и доминирование фирмикут усугубляется, что, по-видимому,

отражает снижение разнообразия экологических ниш для представителей эубактерий. Выявленные существенные изменения структуры эубактериальной компоненты метаногенного сообщества в ходе процессов анаэробного сбраживания подчёркивают возможность дальнейшей детализации динамики структуры сообщества.

Литература

1. Bacchetti De Gregoris T.B., Aldred N., Clare A.S., Burgess J.G. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa // Journal of Microbiological Methods. V. 86. P. 351–356. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.010
2. Enzmann F., Mayer F., Rother M., Holtmann D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications // AMB Express, 2018, 8, 1. doi:10.1186/s13568-017-0531-x
3. Pampillón-González L., Ortiz-Cornejo N.L, Luna-Guido M., Dendooven L., Navarro-Noya Y.E. Archaeal and bacterial community structure in an anaerobic digestion reactor (Lagoon Type) used for biogas production at a pig farm // J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2017, 27, 306-317. doi:10.1159/000479108
4. Sun L., Liu T., Müller B., Schnürer A. The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests // Biotechnology for Biofuels, 2016, 9, 128. doi:10.1186/s13068-016-0543-9
5. Yang Y.W., Chen M.K., Yang B.Y., Huang X.J., Zhang X.R., He L.Q., Zhang J., Hua Z.C. 2015. Use of 16S rRNA Gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces // Applied and Environmental Microbiology. V. 81. N. 19. P. 6749-6756. doi: 10.1128/AEM.01906-15

Выщелачивание металлов из стекловидных шлаков силикатными бактериями

Абашина Т.Н.^{1,2}, Делеган Я.А.¹, Яцкив А.А.^{1,2}, Вайнштейн М.Б.^{1,2}, Kumar S.³

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино
vain@ibpm.pushchino.ru

² ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

³ Department of Biotechnology and Bioinformatics, Jaypee University of Information Technology, Wazirpur, Solan, India

Биовыщелачивание минерального сырья с помощью микроорганизмов играет заметную роль при добыче ценных металлов из отходов промышленности как вторичного сырья. Преимуществом биотехнологий по сравнению с другими методами добычи являются относительная экономичность (отсутствие затрат на плавильные процессы) и отсутствие ущерба для окружающей среды. В настоящее время биовыщелачивание металлов успешно применяется для переработки сульфидных руд и концентратов, в которых сульфидные минералы являются субстратом для хемолитоавтотрофных бактерий и архей [1]. Извлечение ценных металлов из силикатных руд, силикатных твердых отходов и стекловидных шлаков до сих пор осуществляется физическими и химическими технологиями в связи с тем, что силикаты не могут служить достаточными субстратами, и разрушение силикатных минералов микроорганизмами требует дополнительного внесения органических соединений. В основном работы с применением «силикатных бактерий» (то есть бактерий, для которых показана способность разрушать силикатное сырье) в настоящее время находятся на уровне исследовательских разработок [2, 3], при этом было показано [4, 5], что результаты процессов бактериального выщелачивания силикатных материалов варьировали в зависимости от состава минералов и от применяемых штаммов.

БИОХИМИЯ

УДК 577.29

ПОДБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ МИКРОБНОЙ ДНК ИЗ СБРАЖИВАЕМОЙ МАССЫ БИОГАЗОВЫХ ПРОИЗВОДСТВ*

**К.С. Бояршин¹, Ю.Р. Ходжаев¹, Е.Ф. Сорокина¹, В.А. Яценко¹,
В.В. Клюева¹, И.К. Мейлах^{2,3}, В.П. Бредихин^{2,3}, И.В. Батлуцкая¹**

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

²ООО«АльтЭнерго», Белгород

³АО«Белгородский институт Альтернативной энергетики», Белгород

Технология переработки органических отходов с получением биогаза и органических удобрений основана на их микробиологическом разложении и сбраживании. В её основе лежит спонтанное формирование сложного микробного сообщества, характеризующегося распределением экологических ниш и развитыми трофическими связями. Экологическая и таксономическая структура этого сообщества может служить важным показателем при оптимизации технологии и поддержании стабильности производственного процесса. Перспективным методом анализа таксономической структуры сложных микробных сообществ является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ), требующая получения очищенных препаратов суммарной микробной ДНК из образцов сложного химического состава. Данная работа посвящена подбору недорогого и эффективного метода получения таких препаратов из сбраживаемой массы биогазовых производств. Показана пригодность и эффективность метода, основанного на применении сорбирующих ДНК микрочастиц отечественного производства, предложены меры по его улучшению.

Ключевые слова: *выделение ДНК, микробные сообщества, биогаз, ПЦР РВ, микрочастицы.*

DOI: 10.26456/vtbio97

Введение. Эффективным способом утилизации органических отходов животноводства, растениеводства и пищевой промышленности является их сбраживание с получением биогаза – многокомпонентной газовой смеси, обладающей горючими

* Исследование выполнено при поддержке гранта Департамента агропромышленного комплекса и воспроизводства окружающей среды Белгородской области.

свойствами за счёт высокого содержания метана. Разложение отходов и последующее сбраживание продуктов разложения обеспечивается самостоятельно формирующимся сообществом микроорганизмов, включающим большое число видов различной таксономической принадлежности, способных к жизни в анаэробных условиях. Состав таких сообществ представляет немалый интерес с точки зрения биотехнологии переработки отходов (Traversi et al., 2012; Diaz et al., 2010).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ) (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993) нашла широкое применение в микробиологических исследованиях (Maskay et al., 2007) благодаря способности различения филогенетически обусловленных особенностей последовательностей ДНК различных микробных таксонов. Эта способность обеспечивается разработкой праймеров с таксонной и групповой специфичностью, характеризующихся соответствием уникальным последовательностям в геномной ДНК, специфичным для определённой группы или таксона микроорганизмов (Baker et al., 2003). Существуют примеры успешного использования этого метода для анализа микрофлоры почв (Fierer et al., 2005; Бражникова и др., 2012), кишечной микрофлоры животных (Heinritz et al., 2016; Furet et al., 2009) и человека (Matsuki et al., 2004; Полуэктова и др. 2014), других сложных микробных сообществ. Внедрение молекулярно-биологических методов в практику их изучения продемонстрировало, в частности, избытие в средовых и биологических образцах видов микроорганизмов, для которых до сих пор не были подобраны условия, позволяющие их культивирование (Cassler et al., 2008; Smith, Osborn, 2009).

Подбор и отработка методов выделения суммарной ДНК микробных сообществ для анализа молекулярно-биологическими методами нередко представляет собой непростую задачу и становится темой развёрнутых исследовательских работ (Stinson et al., 2018; Liu et al., 2018). В нашем случае мы поставили задачу подобрать метод не просто подходящий и эффективный, но также относительно дешёвый, благодаря отказу от импортных реактивов и материалов, закупка и доставка которых обычно связана с существенными затратами денег и времени. Достижение цели осложнялось характером проб, содержавших широчайший спектр органических соединений за счёт разнообразия отходов, используемых в промышленном биогазовом реакторе.

Подбор и оптимизация метода выделения ДНК из микробного сообщества биогазового реактора стали продолжением предпринятых нами ранее работ, направленных на модернизацию и повышение эффективности технологии анаэробного сбраживания органических

отходов (Батлуцкая и др., 2016). Отработанная на данном этапе методика закладывает основу для дальнейшей экспериментальной работы, результатом которой должна стать разработка методов анализа состава микробных сообществ, обеспечивающих переработку отходов, в целях оптимизации технологии и контроля промышленных процессов.

Методика. Образцы сброживаемой массы были отобраны из биореактора биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» в сентябре 2017 г. и хранились в замороженном состоянии при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Сброживаемая масса (смесь субстратов в процессе их ферментации) включала навозные стоки, мясные отходы, кукурузный силос, сахаросвекольный жом и другие органические компоненты в измельчённом состоянии.

Выделение ДНК методом фенольной экстракции. Методика выделения суммарной геномной ДНК микробного сообщества реактора биогазовой станции из проб сброживаемой массы путём фенольной экстракции (Maniatis et al., 1982) включала следующие этапы:

- 1) Дополнительное измельчение частиц сброживаемой смеси в объёме 100 мл при помощи ручного блендера в течение 2 мин.
- 2) Экстракция ДНК фенолом.
- 3) Экстракция ДНК хлороформом.
- 4) Переосаждение ДНК этанолом.

Дополнительное измельчение частиц сброживаемой смеси при помощи ручного блендера представляется необходимым по причине неравномерности распределения микроорганизмов в субстратной смеси. Субстратная смесь представляет собой водную суспензию с частицами различного размера. Размеры наиболее крупных частиц могут достигать до нескольких миллиметров. Развитие микроорганизмов при этом может происходить как на их поверхности, так и в глубине. Таким образом, дополнительное измельчение частиц субстратной смеси необходимо для более полной экстракции ДНК микробного сообщества.

Экстракция 250 мкл полученного гомогенизата фенолом проводилась с использованием препарата фенола, насыщенного 10 мМ буферным раствором трис-HCl pH 8,0, при соотношении объёмов фенола и экстрагируемой смеси 1:1. После добавления фенола смесь встряхивали, доводя до состояния эмульсии, затем центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при скорости 10000 об/мин. Водную фазу отбирали и добавляли к ней хлороформ в объёмном соотношении 1:1, и также встряхивали до состояния эмульсии, затем центрифугировали. К отобранной водной фазе добавляли 96% этанол в объёмном соотношении 2,5 объёмных

единицы этанола к 1 объёмной единице смеси, встряхивали и центрифугировали при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин. Полученный осадок промывали 100 мкл 70% этанола, центрифугировали и высушивали на воздухе, а затем растворяли в 250 мкл деионизированной воды.

Выделение ДНК методом щелочного лизиса. Выделение ДНК методом щелочного лизиса (Birnboym, Doly, 1979) проводилось с использованием набора реактивов «ДНК-Экстран-3» (ЗАО «Синтол», EX-513-100) отечественной фирмы «Синтол». К 30 мкл субстрата добавляли 20 мкл лизирующего раствора, и, после гомогенизации растиранием при помощи стеклянной палочки в присутствии стерилизованного песка, ещё 280 мкл раствора. Далее вносили 3 мкл раствора РНКазы и, после перемешивания, инкубировали в течение часа при 60 °С. Затем к полученному лизату добавляли 100 мкл осаждающего раствора «1» и после перемешивания центрифугировали при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин. Супернатант переносили в чистые пробирки, осаждали при помощи 300 мкл осаждающего раствора «2» и перемешивали. Затем повторяли центрифугирование, удаляли жидкость и высушивали осадок. Осадок растворяли в 30 мкл деионизированной воды. Точный состав растворов является коммерческим секретом фирмы-производителя.

Выделение ДНК с использованием магнитных частиц. Выделение ДНК с использованием магнитных частиц проводили при помощи реактивов, входящих в набор «М-Сорб-ООМ» (ЗАО «Синтол», ООМ-502) фирмы «Синтол». К 100 мкл пробы промышленного субстрата для получения биогаза добавляли смесь 500 мкл лизирующего раствора и 10 мкл лизирующего компонента, перемешивали и инкубировали 15 мин при 65 °С. Затем центрифугировали смесь при 4000 об/мин в течение 30 сек. К супернатанту добавляли 60 мкл сорбирующего раствора, содержащего магнитные частицы, и 400 мкл осаждающего раствора, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем центрифугировали пробирки при 4000 об/мин в течение 3 мин. После удаления надосадочной жидкости вносили в пробирки по 500 мкл промывочного раствора «А», перемешивали и вновь центрифугировали. После центрифугирования устанавливали пробирки на 1 мин на магнитный штатив для отделения магнитных частиц от жидкости, в которой они суспендированы. Жидкость удаляли, к осадку добавляли 500 мкл промывочного раствора «Б». Затем вновь перемешивали, центрифугировали (как и ранее, 4000 об/мин, 3 мин), и на 1 мин помещали на магнитный штатив. Таким же образом проводили промывку промывочным раствором «С». После удаления раствора «С» инкубировали пробирки с открытыми

крышками при 65 °С для выпаривания остатков жидкости в течение 5 мин. Для элюции ДНК с магнитных частиц, добавляли к ним 100 мкл элюирующего раствора, перемешивали и термостатировали в течение 10 мин при 65 °С. Затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 3 мин и устанавливали на 1 мин на магнитный штатив. Водную фазу, содержащую ДНК, отбирали и замораживали для хранения. Точный состав использованных растворов является коммерческим секретом фирмы-производителя.

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Объем всех трёх полученных препаратов был равен объёму материала, из которого проводилось выделение ДНК в каждом из случаев, что обеспечивало соответствие концентрации ДНК в растворах эффективности применённого метода. 5 мкл каждого препарата было нанесено на 1%-ный агарозный гель, приготовленный на стандартном трис-боратном буферном растворе. После разгонки электрофореграмма визуализировалась путём окрашивания бромистым этидием. Сравнение дорожек электрофореграммы проводилось визуально в проходящих ультрафиолетовых лучах.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ). Для проведения ПЦР РВ использовали реактивы отечественной компании ЗАО «Синтол» (ЗАО «Синтол», М-427). Смеси объёмом по 25 мкл содержали по 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, по 7,5 мкл растворов праймеров, добавляемых до конечной концентрации 0,33 пмоль/мкл каждого, 2 мкл препарата ДНК-матрицы и 5,5 мкл деионизированной воды. Таким образом, реакции велись с использованием рекомбинантной ДНК-полимеразы *SynTaq* при pH 8,8, в присутствии 2,5 mM MgCl₂, с детекцией продукта по флуоресценции красителя SYBR Green I. Использовались четыре пары таксон-специфических праймеров, комплементарных последовательности гена 16S рРНК, подобранных на основании литературных данных (Yang et al., 2015; Guo et al., 2008; De Gregoris et al., 2011).

Программа термоциклера для ПЦР РВ CFX96 Touch фирмы «Bio-Rad» содержала этап плавления ДНК и активации ДНК-полимеразы при температуре 96 °С продолжительностью 5 мин. За ним следовали 40 циклов амплификации, включавшие по три этапа продолжительностью 20 сек: плавления при 96 °С, отжига праймеров при 60 °С и элонгации растущей цепи при 72 °С.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты позволили подобрать эффективную методику выделения суммарной геномной ДНК микробного сообщества сбраживаемой массы биогазовой станции и подтвердить пригодность полученного препарата для анализа методом ПЦР РВ.

Сравнение результатов применения различных методов выделения ДНК. Путём применения трёх различных подходов, нами были получены три препарата суммарной геномной ДНК микробного сообщества промышленного биогазового реактора. Был проведён их сравнительный анализ методом электрофореза в агарозном геле. Полученная электрофореграмма (рис. 1) продемонстрировала максимальный выход ДНК при использовании метода, основанного на использовании магнитных частиц. Меньший выход был получен при использовании метода фенольной экстракции, минимальный – при использовании метода, основанного на щелочном лизисе клеток и предназначенного производителем набора реактивов прежде всего для экстракции ДНК из свежих растительных тканей («Синтол», ЕХ-513-100).

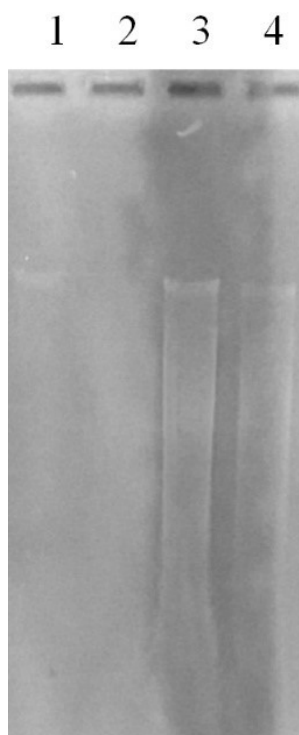


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов суммарной геномной ДНК, выделенной из сбрасываемой массы биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» (2 – 4) в сравнении с препаратом геномной ДНК сенной палочки (*Bacillus subtilis*) (1). 2 – препарат, полученный методом щелочного лизиса, 3 – препарат, полученный с использованием магнитных частиц, 4 – препарат, полученный путём фенольной экстракции

Таким образом, сравнение количества выделенной ДНК с использованием описанных методов показало наибольшую эффективность использования магнитных частиц для её сорбции и

отмывки. На основании полученных результатов для дальнейшего анализа был выбран препарат, полученный с использованием магнитных частиц, соответствующий метод, разработанный на основе методики фирмы «Синтол» («Синтол», ООМ-502), был выбран для дальнейшего применения.

При этом, выход ДНК является не единственной существенной характеристикой метода выделения ДНК для использования в ПЦР РВ, более существенной является чистота препарата и отсутствие в нём ингибиторов ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (Demeke, Jenkins, 2010).

Ингибиторами полимеразной цепной реакции могут служить оставшиеся при очистке образцов ДНК компоненты клеток, из которых эта ДНК была выделена – такие как белки и РНК. Также реакцию способны ингибировать остаточные количества реактивов, применявшихся на различных стадиях пробоподготовки – фенол, спирты, магнитные частицы. Качественный вывод о присутствии веществ, способных ингибировать полимеразную цепную реакцию, в существенных количествах, может быть сделан, основываясь на возможности протекания полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матрицы данного препарата ДНК. Нами была проведена проверка пригодности выбранного препарата для анализа методом ПЦР РВ.

В реакционных смесях нами были использованы четыре пары таксон-специфических праймеров (Табл.1). Две из них, 926F/1062R и Eub338F/Eub518R, согласно опубликованным данным, обладают специфичностью к последовательностям гена 16S рибосомальной РНК большинства организмов, относящихся к царству эубактерий (*Bacteria*). Другая, Firm934F/Firm1060R – к тому же гену входящего в царство эубактерий типа фирмикуты (*Firmicutes*). Параллельное использование этих трёх пар, дающих ПЦР-продукты сходной длины (200-300 п.н.), и способных функционировать при одинаковой температуре отжига (60 °С), позволило подтвердить возможность их функционирования на выбранном препарате ДНК (рис. 2). Четвёртая пара, 27F/1525R, как и две другие, специфична к эубактериям, однако при этом направляет синтез значительно более длинного ПЦР-продукта (1500 п.н.). Она не предназначена для использования в сравнительной оценке представленности узнаваемых ею последовательностей (Yang et al., 2015), и действительно демонстрирует существенно отличающиеся результаты.

Полученные результаты продемонстрировали скорости амплификации последовательностей ДНК с использованием праймеров, специфичных к таксонам различного ранга, позволяющие их применение с полученным нами препаратом геномной ДНК

микробного сообщества промышленного биогазового реактора. Четвёртая пара праймеров, дающая ПЦР-продукт значительно большей длины (около 1500 п.н.), закономерно демонстрирует более низкую скорость амплификации и выход кривой на плато при более низком значении интенсивности флуоресценции, что лишь подтверждает предсказуемое поведение системы.

Значения C_q , безразмерной величины, выступающей количественным результатом анализа ДНК-содержащих проб путём ПЦР РВ, являются сходными для двух пар праймеров, предназначенных для детекции генов 16S рРНК видов царства эубактерии (табл. 1). Также сходными являются значения C_q , полученные для парных повторностей, что положительно характеризует воспроизводимость полученных результатов. Использование пары праймеров, специфичной к типу фирмикуты, распространённому таксону низшего по отношению к царству эубактерии ранга, показывает большее значение C_q , и, соответственно, меньшую представленность низшего таксона, как и следует ожидать в таком случае. При этом, доля фирмикут в микробном сообществе биогазового реактора, как следует из результатов эксперимента, весьма высока, что не вызывает удивления, учитывая имеющиеся данные о высокой представленности этого типа эубактерий в кишечной микрофлоре млекопитающих (Yang et al., 2015).

Таблица 1
Пары праймеров, использованные в работе и значения C_q , полученные в реакциях ПЦР РВ с их использованием

Специфичность пары праймеров	Названия праймеров	Последовательности праймеров	Длина ПЦР-продукта, п.н.	Значение C_q (безразмерная величина)
Царство Эубактерии	926F 1062R	AAACTCAAARKGAATTGACGG CTCACRRACAGCTGAC	136	18,15
Царство Эубактерии	Eub338F Eub518R	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	200	18,25
Тип Фирмикуты	Firm934F Firm1060R	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	126	18,62
Царство Эубактерии	27F 1525R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGWTCARCC	150 0	25,67

Таким образом, пробный эксперимент подтвердил пригодность полученного препарата ДНК-матрицы для анализа путём количественной ПЦР. В ходе эксперимента получены ожидаемые результаты, свидетельствующие в пользу адекватности выбранного метода выделения ДНК и выбранных условий эксперимента.

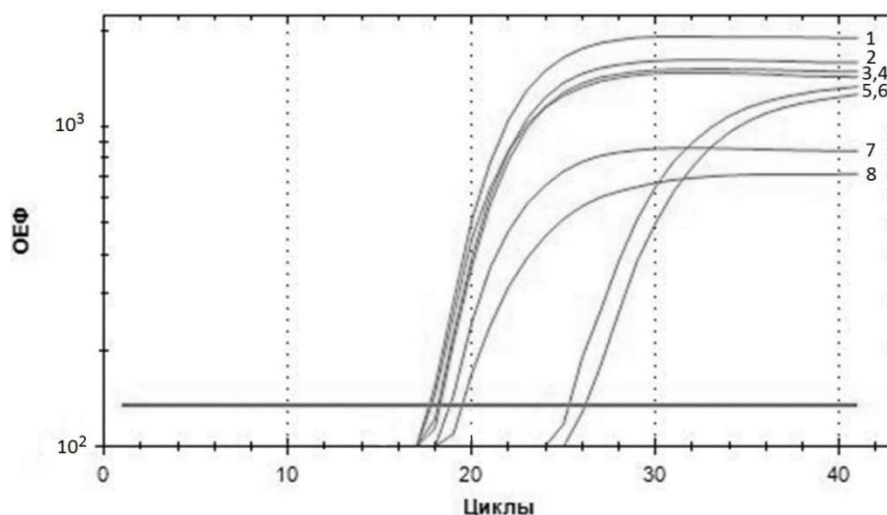


Рис. 2. Кривые флуоресценции в реакционных смесях, полученные на препарате суммарной геномной ДНК микробного сообщества промышленного биореактора биогазовой станции «Лучки» методом ПЦР РВ с использованием четырёх пар праймеров, специфичных к последовательностям генов 16S рРНК и характеризующихся различными специфичностями и длиной синтезируемого ПЦР-продукта. Далее указаны специфичности и названия праймеров: 1,2 – царство эубактерии (*Eubacteria*, 926F/1062R); 3,4 – царство эубактерии (*Eubacteria*, Eub338F/Eub518R); 5,6 – царство эубактерии (*Eubacteria*, 27F/1525R), длинный ПЦР-продукт (1500 п.н.); 7,8 – тип фирмикуты (*Firmicutes*, Firm934F/Firm1060R). Каждая реакция проведена в двух параллельных повторностях

Опыт экстракции фенолом препарата ДНК, полученного с использованием магнитных микрочастиц, показал формирование заметного белого осадка на границе раздела фенольной и водной фаз, что может свидетельствовать о наличии в препарате остаточных количеств примесей. Данные примеси, как уже было показано, не делают невозможной работу ДНК-полимеразы в ПЦР РВ, однако, в дальнейшем мы склоняемся к последовательному применению очистки ДНК на магнитных частицах, экстракции фенолом, хлороформом и спиртового осаждения (как это описано в разделе «Объект и методика»), для достижения максимально надёжного результата. Данная модификация метода не повышает сколько-нибудь

существенно его стоимость и не выводит его продолжительность за рамки нескольких часов.

Заключение. На основании анализа полученных данных можно сделать следующие выводы:

Показана эффективность применения метода выделения ДНК, основанного на использовании сорбирующих магнитных микрочастиц производства компании «Синтол» (Россия) для получения препаратов суммарной геномной ДНК микробных сообществ промышленных биогазовых реакторов.

Подтверждена применимость полученного этим методом препарата для анализа методом ПЦР РВ.

Проведено наблюдение, указывающее на целесообразность дополнять указанную методику экстракцией полученного препарата фенолом и хлороформом с последующим спиртовым осаждением.

Список литературы

- Батлуцкая Н.В., Бредихин В.П., Мейлах И.К., Украинский П.В., Кистаубаева А.С., Ключева В.В., Дегтярёва К.А., Кортюкова Е.А., Шкуропат М.Н.* 2016. Влияние целлюлозоразрушающих ферментов на активность метанообразующих бактерий в условиях лабораторной биогазовой установки АО «Белгородский институт альтернативной энергетики» на субстрате действующей биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» // Научные ведомости БелГУ, Серия Естественные науки. Вып. 37. № 25. С. 56-62.
- Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Шигаева М.Х., Цзю В.Л., Игнатова Л.В., Бержанова Р.Ж., Сыдыкбекова Р.К., Каргаева М.Т.* 2012. Молекулярно-биологические методы в оценке микробного разнообразия почв // Вестник КазНУ. Серия биологическая. Т. 1. № 53. С. 65-69.
- ЗАО «Синтол».* 2017. Кат. № EX-513-100. ДНК-Экстран-3 Набор реагентов для выделения геномной ДНК из растений // Руководство пользователя. www.syntol.ru.
- ЗАО «Синтол».* 2017. Кат. № M-427. 2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I // Руководство пользователя. www.syntol.ru.
- ЗАО «Синтол».* 2017. Кат. № OOM-502. Набор реагентов «М-Сорб-ООМ» для выделения ДНК/РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды // Руководство пользователя. www.syntol.ru.
- Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Шифрин О.С., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т.* 2014. Современные методы изучения микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Т. 2. С. 85-91.
- Baker G., Smith J.J., Cowan D.A.* 2003. Review and re-analysis of Domain-specific 16S primers // Journal of Microbiological Methods. V. 55. № 3. P. 541-555. doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.

- Birnboim H.C., Doly J.* 1979. A rapid procedure for screening recombinant alkaline plasmid DNA // *Nucleic Acids Research*. V. 7. P. 1513-1523.
- Cassler M., Peterson C.L., Ledger A., Pomponi S.A., Wright A.E., Winegar R., McCarthy P.J., Lopez J.V.* 2008. Use of Real-Time qPCR to Quantify Members of the Unculturable Heterotrophic Bacterial Community in a Deep Sea Marine Sponge *Vetulina sp.* // *Microbial Ecology*. V. 55. P. 384-394. doi: 10.1007/s00248-007-9283-5.
- De Gregoris T.B., Aldred N., Clare A.S., Burgess J.G.* 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa // *Journal of Microbiological Methods*. V. 86. P. 351-356. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.010.
- Demeke T., Jenkins G.R.* 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. V. 396. № 6. P. 1977-1990. doi: 10.1007/s00216-009-3150-9.
- Díaz C.; Baena S.; Patel B.K.C.; Fardeau M.L.* 2010. Peptidolytic microbial community of methanogenic reactors from two modified UASBs of brewery industries // *Brazilian Journal of Microbiology*. V. 41. № 3. P. 707-717. doi: 10.1590/S1517-83822010000300022.
- Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B.* 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays // *Applied and Environmental Microbiology*. V. 71. № 7. P. 4117-4120. doi: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.
- Furet J.-P., Firmesse O., Gourmelon M., Bridonneau C., Tap J., Mondot S., Doré J., Corthier G.* 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR // *FEMS Microbiology Ecology*. V. 68. № 3. P. 351-362. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x.
- Guo X., Xia X., Tang R., Zhou J., Zhao H., Wang K.* 2008. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs // *Letters in Applied Microbiology*. V. 47. P. 367-373. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x.
- Heinritz S.N., Weiss E., Eklund M., Aumiller T., Louis S., Rings A., Messner S., Camarinha-Silva A., Seifert J., Bischoff S.C., Mosenthin R.* 2016. Intestinal microbiota and microbial metabolites are changed in a pig model fed a high-fat/low-fiber or a low-fat/high-fiber diet // *PLoS One*. V. 11. N. 4. e0154329. doi: 10.1371/journal.pone.0154329.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R.* 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // *Biotechnology*. V. 10. P. 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R.* 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions // *Biotechnology*. V. 11. P. 1026-1030.
- Liu X., Xu Y., Li Z., Jiang S., Yao S., Wu R., An Y.* 2018. A silica sands-based method for faithful analysis of microbial communities and DNA isolation from a wide range of species // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*.

- March 21 (Epub ahead of print). doi: 10.1080/10826068.2018.1451885.
- Mackay I.M.* 2007. Real-Time PCR in Microbiology. Poole: Caister Academic Press. 454 p.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.* 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 545 p.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R.* 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces // *Applied and Environmental Microbiology*. V. 70. № 12. P. 7220-7228. doi: 10.1128/AEM.70.12.7220-7228.2004.
- Smith C.J., Osborn A.M.* 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology // *FEMS Microbiology Ecology*. V. 67. № 6–20. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- Stinson L.F., Keelan J.A., Payne M.S.* 2018. Comparison of meconium DNA extraction methods for use in microbiome studies // *Frontiers in Microbiology*. V. 9. Article 270. doi: 10.3389/fmicb.2018.00270.
- Traversi D., Villa S., Lorenzi E., Degan R., Gilli G.* 2012. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity // *Journal of Environmental Management*. V. 111. P. 173-177. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.07.021.
- Yang Y.W., Chen M.K., Yang B.Y., Huang X.J., Zhang X.R., He L.Q., Zhang J., Hua Z.C.* 2015. Use of 16S rRNA Gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces // *Applied and Environmental Microbiology*. V. 81. № 19. P. 6749-6756. doi: 10.1128/AEM.01906-15.

SELECTION AND OPTIMIZATION OF THE METHOD OF ISOLATION OF THE TOTAL MICROBIAL DNA FROM THE FERMENTED MASS OF BIOGAS PLANTS

K.S. Boyarshin¹, Yu.R. Khodzhaev¹, E.F. Sorokina¹, V.A. Yatsenko¹, V.V. Klyueva¹, I.K. Meilakh^{2,3}, V.P. Bredikhin^{2,3}, I.V. Batlutskaya¹

¹Belgorod State National Research University, Belgorod

²Limited Liability Company «AltEnergо», Belgorod,

³Joint-stock company "Belgorod Institute of alternative Energy", Belgorod

The technology of processing of the organic waste with the production of biogas and organic fertilizers is based on their microbiological decomposition and fermentation. It is based on the spontaneous formation of a complex microbial community, characterized by the distribution of ecological niches and developed trophic connections. The ecological and taxonomic structure of this community can serve as an important indicator in

optimizing the technology and maintaining the stability of the production process. A promising method for analyzing the taxonomic structure of complex microbial communities is real-time polymerase chain reaction (RT PCR), requiring purified preparations of total microbial DNA from samples with complex chemical composition. Here we analyze the selection of an inexpensive and effective method of obtaining such preparations from the fermented mass from biogas plants. The suitability and effectiveness of the method based on the use of DNA sorbent microparticles of domestic production is shown. We also suggest measures to improve it.

Keywords: *isolation of DNA, microbial communities, biogas, RT PCR, microparticles.*

Об авторах:

БОЯРШИН Константин Сергеевич – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: kboyarshin@mail.ru.

ХОДЖАЕВ Юсуфалихужа Рустамугли – студент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: 1197518@bsu.edu.ru.

СОРОКИНА Елена Фёдоровна – студент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: 835688@bsu.edu.ru.

ЯЦЕНКО Виктория Александровна – студент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: 1257489@bsu.edu.ru.

КЛЮЕВА Виолетта Викторовна – ассистент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: klyueva@bsu.edu.ru.

МЕЙЛАХ Илья Константинович – главный инженер биогазовой установки БГС «Лучки» ООО «АльтЭнерго», 308000, Белгород, проспект Славы, 28, e-mail: meylakh@mail.ru.

БЕРДИХИН Владимир Пантелеймонович – генеральный директор АО "Белгородский институт альтернативной энергетики", 308000, Белгород, проспект Славы, 28, e-mail: bvp@altenergo.su.

БАЛТУЦКАЯ Ирина Витальевна – доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: bat@bsu.edu.ru.

Бояршин К.С. Подбор и оптимизация методики выделения суммарной микробной ДНК из сбраживаемой массы биогазовых производств / К.С. Бояршин, Ю.Р. Ходжаев, Е.Ф. Сорокина, В.А. Яценко, В.В. Клюева, И.К. Мейлах, В.П. Бредихин, И.В. Батлущая // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2019. № 3(55). С. 47-60.