

УДК 632.4.01/.08

DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-159-162

## АПРОБАЦИЯ НЕПРЯМОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ПОЧВЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ЧЕРНОЗЕМОВ ВЫЩЕЛОЧЕННЫХ

**Федорович С. В., Астапчук И.Л., канд. биол. наук, Черников Е.А., канд. с.-х. наук**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)*

**Реферат.** В статье представлены данные по апробированию непрямого метода выделения ДНК из почвы для идентификации почвенной микробиоты черноземов выщелоченных на основе анализа гена 16s рРНК. Для данного метода был установлен оптимальный объём навески почвы 0,3-0,4г. Выделение ДНК из образцов в зависимости от глубины слоя показали, что наибольшая концентрация была получена из образцов с глубин 10-20, 20-30 см. В результате анализа были получены препараты тотальной ДНК в различных концентрациях и различной оптической чистоты.

**Ключевые слова:** почвенная микробиота, ген 16S рРНК, бактерии, выделение ДНК

**Summary.** The article presents data on the testing of an indirect method of DNA extraction from soil to identify the soil microbiota of leached chernozems based on the analysis of the 16s rRNA gene. For this method, the optimal amount of soil sample was set at 0.3 - 0.4 g. Isolation of DNA from samples depending on the depth of the layer showed that the highest concentration was obtained from samples from depths of 10-20, 20-30 cm. As a result of the analysis, preparations of total DNA were obtained in various concentrations and different optical purity.

**Key words:** soil microbiota, 16S rRNA gene, bacteria, DNA extraction

**Введение.** Микроорганизмы – главный и неотъемлемый компонент агроэкосистемы, который считается важным показателем устойчивости почв. Диагностика разнообразия почвенной микробиоты является приоритетной задачей отраслевых исследований в агропромышленном комплексе, в том числе и в садоводстве. Большинство исследований разнообразия микроорганизмов в почвах проводится классическими методами [1-2], однако, в лабораторных условиях на искусственных питательных средах невозможно культивировать большую часть прокариот, населяющих почву [3].

Совершенствование методов секвенирования нового поколения привело к широкому распространению метагеномики для оценки разнообразия микробных сообществ образцов разной природы [4-5], так как данный метод позволяет учесть некультивируемые и редкие микроорганизмы почв. Изучение почвенного метагенома основано на выделении тотальной ДНК из образца и дальнейшем секвенировании нуклеотидных последовательностей для их идентификации на различных таксономических уровнях [6]. Самым распространенным методом в метагеномных исследованиях является анализ гена 16S рРНК, на строении которого основана современная филогенетическая классификация прокариотических организмов [7].

В связи с выше сказанным, изучение структуры и разнообразия почвенных микробных сообществ бактерий при помощи метагеномики является актуальным. Цель работы – апробирование непрямого метода выделения ДНК из почвы для идентификации почвенной микробиоты черноземов выщелоченных на основе анализа гена 16s рРНК.

**Объекты и методы исследований.** Исследования были проведены в 2021-2022 гг. в лаборатории агрохимии и почвоведения и в Центр коллективного пользования технологичным оборудованием по направлениям ФГБНУ «Северо-Кавказский

федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия». Отбор почвенных образцов проводили в АО ОПХ «Центральное» на чернозёмах выщелоченных (г. Краснодар) в ризосферной зоне малогабаритным буром конструкции С.Ф. Неговелова послойно по 10 см вниз по профилю до глубины 50 см в трёхкратной повторности [8-10].

Для определения оптимального объёма почвы необходимого для выделения препарата ДНК использовали различные навески: от 0,25-0,5 г. Образцы использовали для выделения ДНК непосредственно после отбора, либо после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течении 1 – 2-х недель. ДНК выделяли из почвы после механического разрушения с использованием стеклянных шариков в 500 мкл натрий-фосфатном буфере с РVP 40. Производили инкубацию образцов при комнатной температуре, затем центрифугировали при 5000 g в течении 10 минут для осаждения почвенных частиц. Супернатант собирали и не задевая осадок переносили в пустые пробирки объёмом 1,5 мл. К супернатанту добавляли 500 мкл раствора Extract RNA (Евроген, Россия) и инкубировали при комнатной температуре 10 минут. В смесь добавляли 400 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1) и производили встряхивание на вортексе в течении 5 минут. Смесь центрифугировали при 12000 g и  $4^{\circ}\text{C}$  в течении 20 мин. Супернатант собирали, не задевая интерфазы, переносили в чистые пробирки и промывали 1 Мл изопропилового спирта, центрифугировали при 12000 g 10 мин, затем сливали спирт и подсушивали осадок. Осадок растворяли в 200 мкл промывочного раствора (200 mM NaCl; 23 mM Tris и 0,1 mM EDTA) и добавляли 400 мкл 96 % этилового спирта. Производили центрифугирование образца при 13000 g 10 мин, раствор сливали. Процедуру повторяли дважды. К полученному в результате осадку добавляли 150 мкл 70 % спирта и центрифугировали в режиме short spin 1 минуту. Спирт сливали, осадок высушивали на воздухе, не допуская пересушивания и растворяли в 50 мкл TE буфера [11-12].

Далее, с очищенной ДНК (10–15 нг) проводили полимеразную цепную реакцию на приборе Biorad T 100 с использованием полимеразы Encyclo (“Евроген”, Россия) и универсальных праймеров [13] к варибельному участку V4 гена 16S рРНК (табл. 1).

Таблица 1 – Праймерные пары к участку V4 гена 16S рРНК бактерий

Домен	Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Концентрация Пмоль/мкл
Бактерии	Eub338	ACT CCT ACG GGA AGC AG	0,5
	Eub518	ATT ACC GCG GCT GCT GG	0,5

Режимы амплификации для идентификации были следующими:  $95^{\circ}\text{C}$  в течении 5 минут, с последующими 35 циклами амплификации –  $95^{\circ}\text{C}$  в течении 15 сек;  $63^{\circ}\text{C}$  в течении 30 сек;  $72^{\circ}\text{C}$  в течении 40 сек;  $72^{\circ}\text{C}$  в течении 10 мин. Для проведения ПЦР использовали коммерческий набор компании Евроген «Encyclo Plus PCR kit». Детекцию продуктов амплификации проводили методом гель-электрофореза в 2 % агарозном геле.

**Обсуждение результатов.** В результате проведенных исследований были получены следующие данные. Так, при выделении ДНК качество и количество выделенной ДНК не имело больших отличий в зависимости от времени хранения образца. Однако концентрация выделенной ДНК имела прямую зависимость от объёма навески. Лучшие результаты были получены при отборе навесок среднего объёма – 0,3-0,4 г. Эти образцы так же обладали лучшими показателями оптической чистоты. Стоит заметить, что во всех образцах, выделенных данным методом по параметру оптической чистоты (260/230), были чрезвычайно низкие значения, что вероятно связано с наличием в образце органических загрязнителей.

Выделение ДНК из образцов в зависимости от глубины слоя показали, что наибольшая концентрация была получена из образцов с глубин 10-20, 20-30 см. В результате анализа были получены препараты тотальной ДНК в различных концентрациях и различной оптической чистоты (табл. 2).

Таблица 2 – Показатели качества тотальной ДНК при выделении в зависимости от глубины пробы

Слой почвы, см	Концентрация ДНК нг/мкл	Оптическая чистота, нм	
		260/230	260/280
0-10	18,23±1,3	2,19±0,2	0,062±0,39
10-20	45,70±2,4	2,04±0,6	0,7±0,45
20-30	39,45±1,6	1,96±0,4	0,25±0,54
30-40	35,65±1,2	2,34±0,5	0,96±0,36
40-50	5,45±0,5	1,78±0,8	0,02±0,01

Для определения качества препаратов ДНК, полученных исследуемым способом, проводили амплификацию участка V4 гена 16S рРНК. При идентификации бактерий получали целевой фрагмент размером – 200 п.о. Препараты с не удовлетворительными значениями оптической чистоты по показателю 260/280 нм, имели целевой продукт после амплификации. Наибольшее влияние на качество ПЦР оказывала концентрация выделенного препарата ДНК. Целевые продукты в препаратах с низкой концентрацией ДНК отсутствовали (рис.).

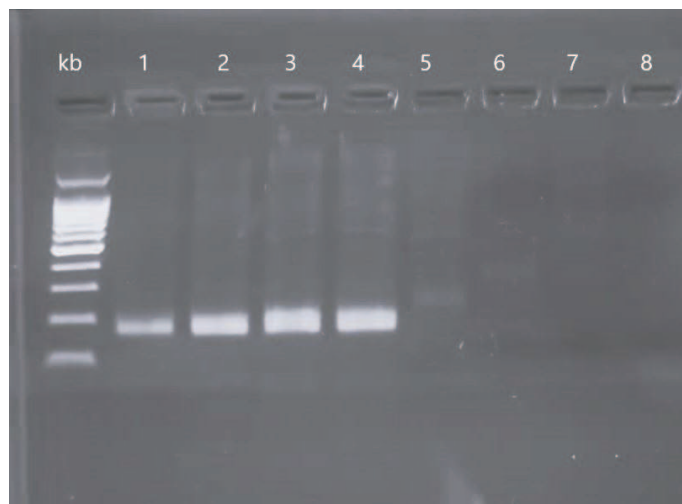


Рис. Результаты ПЦР (16S РНК) анализа идентификации бактерий в образцах почвы

Данные ПЦР анализа показывают, что загрязнители, находившиеся в пробе, не оказывали значительного влияния на ход амплификации. Соответственно в образце отсутствовали ингибиторы ПЦР.

**Выводы.** В результате проведенных исследований был апробирован этап получения качественного препарата ДНК из образцов почвы черноземов выщелоченных. Опытным путем была определена общая масса почвенного образца для определения бактериальных сообществ, максимальная репрезентативность результатов была при массе 0,3-0,4 г.

Исследуемый непрямой метод выделения ДНК позволил выделить препарат ДНК достаточного качества для проведения ПЦР.

### Литература

1. Василенко Е.С., Кутовая О.В., Тхакахова А.К., Мартынов А.С. Изменение интенсивности почвенно-биологических процессов в зависимости от величины агрегатов миграционномицелярного чернозема // Бюл. Почв. инта им. В.В. Докучаева. 2014. № 73. С. 85-97.
2. Кутовая О.В., Василенко Е.С., Лебедева М.П. Микробиологическая и микро-морфологическая характеристика крайнеаридных пустынных почв Илийской впадины (Казахстан) // Почвоведение. 2012. № 12. С. 1297-1309.
3. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Выделение ДНК из образцов почвы (методические указания). СПб.: ВНИИСХМ РАСХН, 2011. 27 с.
4. Першина Е.В., Тамазян Г.С., Дольник А.С., Пинаев А.Г., Сергалиев Н.Х., Андронов Е.Е. Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования // Экологическая генетика. 2012. Т. X, № 2. С. 31–38.
5. Чирак Е.Л., Першина Е.В., Дольник А.С., Кутовая О.В., Василенко Е.С., Когут Б.М., Мерзлякова Я.В., Андронов Е.Е. Таксономическая структура микробных сообществ в почвах различных типов по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена 16S рРНК // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 3. С. 100–109.
6. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды / Андронов Е.Е. и [др.]. СПб.: ВНИИСХМ РАСХН, 2012. 23 с.
7. Tringe S.G., Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene // Current Opinion in Microbiology. 2008. Vol. 11 P. 442-446. DOI10.1016/j.mib.2008.09.011.
8. Малюкова Л.С. Рогожина Е.В., Сергеева Н.Н., Ярошенко О.В. Изучение численности и морфологии представителей основных физиологических групп микробного сообщества двух типов агрогенно измененных садовых почв Юга России // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2021. № 69(3). С. 198-214. DOI: 10.30679/2219-5335-2021-3-69-198-214
9. Методика отбора образцов для секвенирования и изучения метагенома почв / О.В. Кутовая, Н.Б. Хитров, Б.М. Когут, и др. Москва: Почвенный институт имени В.В. Докучаева, 2018. 27 с.
10. Kakirde K.S., Parsley L.C., Liles M.R. Size does matter: Applicationdriven approaches for soil metagenomics // Soil Biol. Biochem. 2010. Vol. 42. P. 1911-1923. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.07.021
11. Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Кутовая О.В. Оценка различных индексов разнообразия для характеристики почвенного прокариотного сообщества по данным метагеномного анализа // Почвоведение. 2015. № 4. С. 462. DOI: 10.7868/S0032180X15040036
12. Чернов Т.И., Холодов В.А., Когут Б.М., Иванов А.Л. Методология микробиологических исследований почвы в рамках проекта "Микробиом России" // Бюллетень Почвенного института им. В.В. Докучаева. 2017. № 87. С. 100-113.
13. Fierer N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use oftaxon-specific quantitative PCR assays // Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71. P. 4117–4120.