

## **ПРОБЛЕМА ИНДИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВНОСИМЫХ В ПОЧВУ**

В связи с биологизацией земледелия и проблемами биоремедиации загрязненных природных сред все большее значение приобретают микробные препараты, вносимые в почву, для стимуляции роста растений, борьбы с корневыми инфекциями, активизации симбиотической фиксации атмосферного азота, а также для разложения нефти и нефтепродуктов, деструкции вредных химических веществ, связывания тяжелых металлов и т.д. Поэтому проблема выживаемости микроорганизмов, вносимых в составе различных препаратов в почву, имеет фундаментальное значение для общей микробиологии и экологии почвенных микроорганизмов. В Казахстане, например, широко ведутся исследования по созданию нитрагина, азотобактерина, нейтрализации ртутных загрязнений почвы и воды, деструкции нефти [1–3].

Выяснение механизмов выживания микроорганизмов в почве, взаимодействия микроорганизмов между собой в микробном ценозе, взаимовлияния почвенных ценозов бактерий, простейших, нематод, насекомых, микроводорослей и высших растений постоянно находится в центре внимания микробиологов.

Прикладные значения обсуждаемой проблемы тесно связаны с вопросами экономики, сельского хозяйства, здоровья и безопасности человека.

Проблема индикации микроорганизмов крайне актуальна. Это важно для контроля инфекций, предотвращения биотерроризма, обнаружения пищевых ядов и экономической оценки эффективности вносимых в окружающую среду микробных препаратов.

Однако зачастую активность вносимых бактерий трудно отделить от активности естественной микробиоты. Обычно микроорганизмы, внесенные в почву, быстро элиминируются автохтонной почвенной микрофлорой в результате конкуренции. В связи с этим для создания экспертных систем по выявлению эффективности микробных препаратов различного назначения весьма актуальна разработка тестов по индикации и выживаемости микробных культур.

Оценка выживаемости микроорганизмов, вносимых в природные среды, имеет два аспекта: индикация культуры, по возможности это должен быть экспресс-анализ, и диагностика активности данной культуры.

С точки зрения индикации микроорганизмов существуют три фундаментальных подхода: микробиологические методы диагностики, иммунологические и молекулярные системы диагностики.

Традиционные микробиологические методы диагностики основаны на определении минимального набора биологических характеристик культуры, детекции одного специфического продукта метаболизма и создании селективных условий роста. Однако эти методы трудоемкие, дорогостоящие и требуют высокой квалификации аналитика [4, 5]. Ряд патогенных микроорганизмов плохо или вообще не растет в культуре, например хламидиозные инфекции. Это может привести к ложноотрицательным результатам с далеко идущими для здоровья последствиями [5].

Методы иммунодиагностики отличаются простотой, возможностью тестирования большого количества материала, высокая чувствительность, но они не всегда специфичны. Данные методы особенно ELISA, наиболее широко распространены при диагностике культур микроорганизмов.

Ферментный иммуносорбционный анализ (ELISA) позволяет идентифицировать высокоспецифичный комплекс антиген-антитело. Суть метода заключается в специфическом связывании первичного антитела с мишенью, затем подбирается к первичному антителу вторичное. Последнее является конъюгатом с определенным ферментом (пероксидаза, уреазы, щелочная фосфатаза), катализирующим трансформацию неокрашенного субстрата в окрашенный продукт реакции, который можно количественно установить методами спектрофотометрии. В результате иммунизации животного антигеном вырабатывается смесь антител, называемая поликлональным препаратом. Недостаток такого препарата – варьирование эффективности от партии к партии.

Создание моноклональных препаратов методом гибридизации *B-лимфоцитов* с миеломными клетками значительно повышает специфичность диагностирования. Полученные гибриды подвергаются субкультивированию для получения клонов, которые вырабатывают моноклональные антитела. Метод моноклональных антител используется для диагностики отдельных типов опухолей, БАВ, патогенов, таких, как СПИД, хламидиоз, гепатит В, герпес, краснуха, легионеллез [5].

Разрабатываются и другие методы иммунодиагностики, в частности иммуномагнитной сепарации [6].

Молекулярные методы диагностики (гибридизация, ПЦР, масс-спектрометрия ДНК) отличаются высокой чувствительностью, быстротой, специфичностью, но они дорогостоящие, анализ многоступенчатый, возможно получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Применение молекулярных маркеров делает процедуру детекции бактерий простой, доступной в полевых условиях и позволяет отличить штаммы одного вида друг от друга. Эта техника значительно упрощает процедуру распознавания специфического штамма, так как большинство маркерных генов дают окрашенные пробы.

Традиционно используют устойчивость к антибиотикам, чаще всего рифампицин и стрептомицин. Рифампицин связывает одну из субъединиц РНК-полимеразы, нарушая этим процесс транскрипции генов. Резистентность возникает в результате мутации, и связывание антибиотика с РНК-полимеразой не происходит. Стрептомицин ингибирует синтез белка вследствие связывания антибиотика с рибосомальной субъединицей. Устойчивость к стрептомицину появляется в результате мутации в этой субъединице и нарушения связывания с антибиотиком. В обоих случаях маркированные штаммы приобретают способность расти на средах с большим количеством указанных антибиотиков [7].

Техника молекулярных маркеров использовалась нами для определения выживаемости клубеньковых бактерий козлятника в различных наполнителях для нитрагина. В работе применялись мутанты бактерий, растущих в питательной среде с большим количеством стрептомицина [1].

Помимо антибиотиков для создания маркеров может быть использована устойчивость к тяжелым металлам, пестицидам и другим экотоксикантам [8].

К. Wilson [7] разработала систему диагностики, использующую ген *gus A*, кодирующий гидrolитический фермент *GUS* –  $\beta$ -глюкуронидаза, в качестве маркера для изучения конкурентной способности штаммов *Rhizobia*. Штаммы легко идентифицируются на корнях и клубеньках бобовых культур при добавлении к ним субстрата для фермента *5-бромо-4-хлоро-3 индолил  $\beta$ -D-глюкуронида (X-glc A)*. Фермент раскалывает

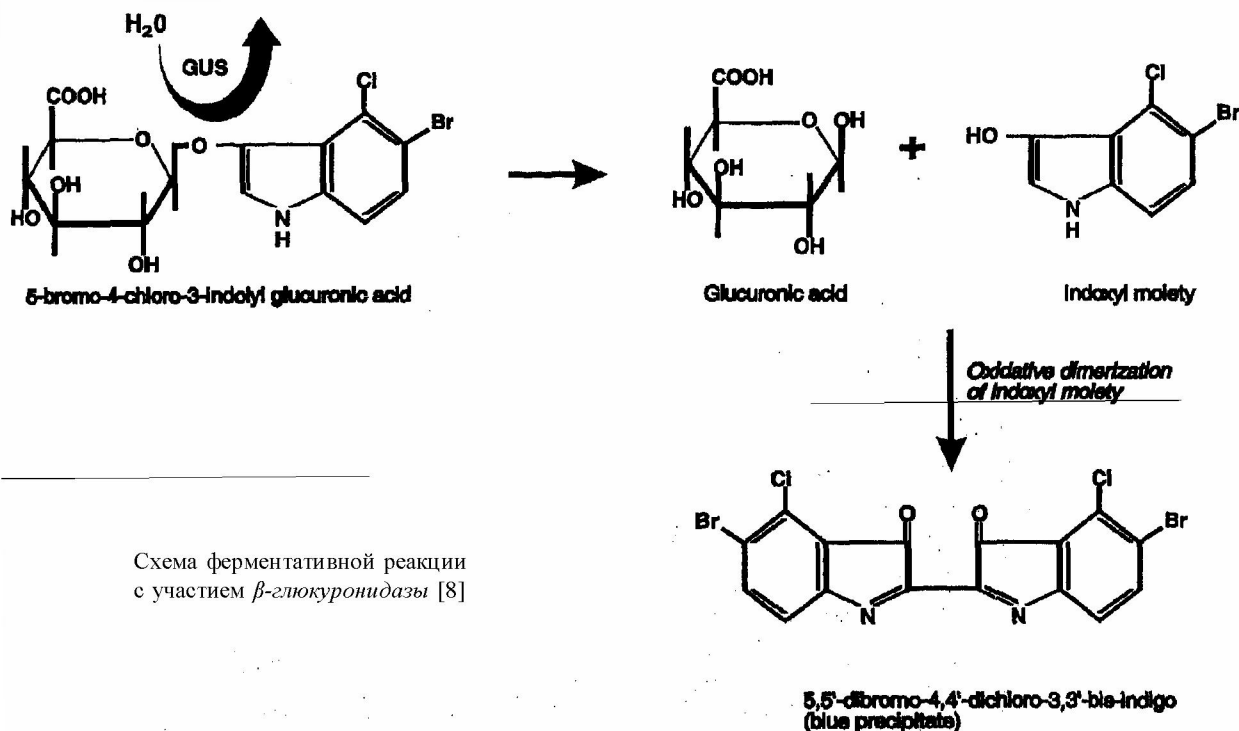


Схема ферментативной реакции с участием  $\beta$ -глюкуронидазы [8]

X-glc A и освобождает производное индоксила, который после димеризации дает соединение 5,5'-дибромо-3,3'-дихлоро-3,3'-бис-индиго темно-синего цвета (см. рисунок).

Ген люциферазы *luc AB* бактериального происхождения, или *luc* ген из светлячков, также широко применяется в микробной экологии. Гены люциферазы обеспечивают свечение при добавлении подходящих субстратов для фермента.

Маркерные гены доставляются в бактерио-реципиент или в виде плазмиды, или в виде участка ДНК, который встраивается в хромосому бактерии.

Обычно в качестве доноров плазмид используют *E. coli* посредством бактериальной конъюгации.

Системы ДНК диагностики основаны на использовании в качестве диагностического маркера строго определенной нуклеотидной последовательности. В большинстве других диагностических методов лежит гибридизация нуклеиновых кислот. Суть метода заключается в следующем:

1. На мембранном фильтре фиксируется одноцепочечная ДНК-мишень.
2. Наносится меченая одноцепочечная ДНК-зонд, которая спаривается с ДНК-мишенью.
3. Промывается фильтр для удаления избытка не связавшейся ДНК-зонд.

4. Детектируются гибридные молекулы зонда/мишени [5].

В последнее время успешно разрабатываются методы индикации бактерий на основе технологии биосенсоров [6], в которой объединены достижения фундаментальных подходов в детекции бактерий с современными физико-химическими методами. Технология обеспечивает непрерывность получения данных, специфичность, быстрый отклик, возможность массовых анализов, простоту пробоподготовки и получение измерений с минимальным нарушением образцов.

Структура биосенсора следующая [6]:



Биосенсор включает чувствительный биологический элемент (фермент, антитело, бактериальная клетка, ДНК), который соединен с преобразователем сигнала. Сигнал же детектируется физико-химическими методами. Наиболее распространены электрохимические, оптические и акустические методы усиления сигнала.

В работе [9] для определения *E. coli* в воде использовали конъюгат антитела с уреазой к

штамму DN5 $\alpha$ , имеющему уникальный видоспецифичный капсульный белок. Потенциометрический датчик обеспечивал обнаружение продуцируемого аммония.

В работе [10] использовали металлический электрод, покрытый искусственной двойной липидной мембраной с внедренными в нее антителами к видам рода *Campilobacter*. Эти белки служили каналами для одновалентных ионов, ток электронов использовался для умножения.

В акустических биосенсорах в качестве датчиков применяются пьезокристаллы и сенсоры поверхностной акустической волны. При связывании антитела с антигеном детектируется звуковой сигнал [6].

Оптические биосенсоры используют оптоволоконную технологию, явление люминесценции, плазменно-резонансную спектроскопию.

В исследованиях [11] применялась люминесценция нуклеиновой кислоты в присутствии красителя SYTOX green, проникновение которой в клетки *Ps. aeruginosa* обеспечивал полиаминоамин дендример. Чувствительная пленка из краски и ПАМД внедрялась внутрь оптических волокон, и затем измерялось свечение нуклеиновых кислот.

В экспериментах S.Chan et al. [12] применены наномасштабные силиконовые сита. Калибруя размер пор под размеры грамтрицательных бактерий и используя селективные рецепторные молекулы для мишеней, можно идентифицировать бактерии с помощью световой интерференции, поскольку слои разных бактерий имеют различные индексы рефракции.

Для идентификации бактерий и грибов применяется технология «электронного носа», имеющего детекторы для летучих органических веществ и газов, образующихся при метаболизме микроорганизмов. В качестве датчиков для определенных летучих соединений и газов используются оксиды металлов и полимерные соединения [6].

На основе этих четырех направлений диагностики бактерий в природных средах разработаны многочисленные модификации методов. Рассмотрим наиболее доступные из них.

P. E. Olsen et al. [13] для идентификации и количественного учета применяли метод ELISA, при этом процедуры проводились на мембранном

фильтре. Окрашенный продукт реакции детектировался спектрофотометрически. В работе использовались поликлональные антитела кролика к клубеньковым бактериям. Вторичное антитело – из антикроличьего козляного коммерческого иммуноглобулина IgG, конъюгированного с пероксидазой фирмы Sigma. Перекись водорода определялась тетраметилбензидином, применяемым в качестве субстрата для фермента. Продукт реакции голубовато-зеленого цвета образовался через 1 мин при положительной реакции.

В работе Ch.Wang et al. [14] изучались колонизация и живучесть рост-стимулирующих бактерий *Ps. fluorescens* шт. CS 85 на корнях проростков хлопчатника с использованием генов-маркеров  $\beta$ -глюкуронидазы (*gus A*) или люцефифразы (*lux B*). Результаты продемонстрировали простоту и быстроту анализов. В исследовании применяли *E. coli* WA803(pDB 30), несущий гены Tn5-*lux AB* с их собственными промоутерами в качестве донора плазмиды. Клетки донора и реципиента смешивали и фильтровали через мембранный фильтр. Полученный трансконъюгат выращивали на среде со стрептомицином и канамицином (KB-KS), обеспечивающей только их рост и свечение в темноте в присутствии *n*-децилальдегида.

Второй штамм *E. coli* S17.1 содержал маркер на основе транспозон-глюкоронидазы *pCAM III: TnSSgusA11*, который поддерживали на среде с тетрациклином. После бактериальной конъюгации тестируемый штамм образовывал голубые колонии на среде KB с антибиотиками и субстратом для фермента  $\beta$ -глюкуронидазы: 5-бromo-4-хлоро-3 индолил-D-глюкуроновая кислота.

Меченые клетки выделяли из корней хлопчатника, помещая кусочки корней в чашки со средой KB-SK. После 18-часовой инкубации внутреннюю поверхность крышки чашки Петри смачивали ватным тампоном с *n*-децилальдегидом и просматривали в темноте, меченые штаммы светились, свечение снимали на камеру. Во втором случае меченые колонии были голубого цвета.

Таким образом, современная методическая база позволяет определять бактерии, вносимые в почву, достаточно просто как в лабораторных, так и в полевых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курманбаев А.А., Топалова О.Б., Садапов А.К. Скрининг и оценка эффективности штаммов *Rhizobium galegae* при инокуляции семян *Galega orientalis* // Поиск. 2000. № 1. С. 44-49.

2. Абдрашитова С.А., Илющенко М.А., Айткельдиева С.А., Абдуллина Г.Г., Курманбаев А.А., Тлеулина Ж.А., Фаломеева О.В. Влияние ртути на разнообразие микроорганизмов в экосистемах Казахстана и биоремедиация загрязненных ртутью вод // Сб. тр. 4-й Российской биогеохимической школы «Геохимическая экология и биогеохимическое изучение таксонов биосферы» 3-6 сентября 2003 г. М., 2003.

3. Уснабаева А.А. Использование углеводородокисляющих микроорганизмов для биорекультивации нефтезагрязненных почв в условиях аридного климата Южного Казахстана: Канд. дис. Алматы, 2005.

4. Практикум по микробиологии // Под ред. А. И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.

5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.

6. Deisingh F.K., Tompson M. Biosensors for the detection of bacteria // Canadian Journal of Microbiology. 2004. V. 50. P. 69-77.

7. Wilson K. Molecular techniques for the study of *Rhizobial* ecology in the field // Soil Biology and Biochemistry. 1995. V. 27, N5. P. 501-512.

8. Заядан Б.К. Возможности использования микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* для генетического мониторинга в искусственной экосистеме // Вестн. КазНУ. Сер. биол. 2002. №2. С. 90-93.

9. Ercole C., Del Gallo M., Pantalone M. et al. A biosensor for *E.coli* based on a potentiometric alternating biosensing transducer // Sens. Actuators. 2002. V. 83. P. 48-52.

10. Ivnitski I., Wilkins E., Tien H.T., Ottova A. Electrochemical biosensor based on supported planar lipid bilayers for fast detection of pathogenic bacteria // Electrochem. Commun. 2000. V. 2. P. 457-460.

11. Chang A.C., Gillespie J.B., Tabacco M.B. Enhanced detection of live bacteria using a dendrimer thin film in an optical biosensor // Anal. Chem. 2001. V. 73. P. 467-470.

12. Chan S., Horner S.R., Fauchet P.M., Miller B.L. Identification of Gram negative bacteria using nanoscale silicon microcavities // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 11797-11798.

13. Olsen P.E., Sande E.S., Keyser H.H. et al. A very rapid enzyme immunoassay for confirmation of *Rhizobial* identity and estimation of cell numbers in fresh broth culture // Can. J. Microbiol. 1998. V. 44. P. 380-385.

14. Wang Ch., Wang D., Zhou Qi. Colonization and persistence of a plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain CS 85, on roots of cotton seedlings // Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. P. 475-481.

Резюме

Топыраққа сіңірілген микроорганизмдердің белсенділігі мен өмір сүру қабілеттігі, жалпы теориялық негізі және индикация проблемаларының жеке аспектілері қарастырылған.

Summary

In the review general-theoretical bases and individual aspects of the problem of indication, activity and survival of the microorganisms introduced in the Soils are considered.

УДК 579: 574; 579.64: 631.46

Институт микробиологии  
и вирусологии МОН РК, г. Алматы Поступила 19.04.06г.