

Н. А. Козыровская, Г. Л. Ковтунович

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Обзор литературы посвящен новым молекулярным методам детекции и идентификации микроорганизмов в окружающей среде. Обсуждаются преимущества новых методов перед традиционно используемыми.

Введение. Техногенная деятельность человека постоянно приводит к нарушению взаимоотношений микроорганизмов в окружающей среде, последствия которого могут оказаться непрогнозируемыми. В связи с этим возникает необходимость изучения генетических вариаций в природных микробных сообществах как следствия изменения радиационного фона Земли, повышения содержания тяжелых металлов, мутагенных агентов в почве и воде. Однако лишь около 20 % микроорганизмов, населяющих биосферу, известны науке в настоящее время. Остальные микроорганизмы не выявляются традиционно используемыми методами. Для исследования изменчивости микроорганизмов под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды нужно, прежде всего, идентифицировать некультивируемые микроорганизмы и понять их роль в биосфере. Это возможно с использованием новых молекулярных методов. В прямой зависимости от надежных методов диагностики патогенных микроорганизмов находится эпидемиологическая обстановка в обществе. Транспортировка и хранение пищевых продуктов, вторичное использование сырья, в том числе пищевого, сточных вод для ирригации сельскохозяйственных угодий, орошения спортивных площадок и мытья улиц требуют чувствительных и быстрых методов микробиологического контроля за их качеством. В медицинской диагностике заболеваний микробной этиологии все острее ощущается необходимость разработки простых и доступных каждой лаборатории методов выявления и идентификации возбудителей болезней. Одной из актуальных в ближайшее время станет проблема мониторинга генетически модифицированных микроорганизмов (ГММО) в окружающей среде, которые сконструированы для доставки в растение биопестицидов [1], биологического азота [2], защиты растения от действия мороза [3], для биоконтроля бактериальных болезней растения [4] и др. Новые методы для наблюдения за их выживанием, распространением в биоценозе и способностью к генетическому обмену информацией с эндемной микрофлорой должны быть высокочувствительными при анализе большого количества проб в короткий срок. Для прогнозирования возможных экологических последствий освобождения ГММО в биосферу важно иметь надежные методы наблюдения не только за генетически измененными микроорганизмами, но и их ДНК, освобождающейся после гибели клетки. Будучи защищенной от воздействия эндонуклеаз, она некоторое время сохраняет биологическую активность после смерти клетки и может при благоприятных обстоятельствах вовлекаться в процесс трансформации бактерий чаще, чем предполагалось ранее [5].

Традиционные методы выделения микроорганизмов и их идентификации, громоздкие и трудоемкие, а также обладающие низкой эффективностью вследствие некультивируемости большинства микроорганизмов, вошли в противоречие с темпами развития науки.

Традиционные методы выделения и идентификации микроорганизмов. Со времен научной деятельности Коха и Виноградского микробиологические методы выделения и идентификации микроорганизмов непрерывно совершенствовались. Их многообразие позволило открыть для науки и общества множество новых видов живых организмов, а также понять их роль в экосистемах.

Для выявления микроорганизмов в природных образцах используют два основных приема: 1) культивирование микроорганизмов в селективных условиях и 2) прямой учет микроорганизмов методами микроскопии. В 1895 г. Виноградский предложил метод селективной культуры, которая проявляет максимально ограниченные функции в благоприятных условиях [6]. Например, при получении селективной культуры азотфиксирующих бактерий применяют среду без источников азота, для выделения целлюлозоутилизирующих бактерий — среду с целлюлозой в качестве единственного источника углерода. Для выделения многих видов бактерий используется оптимальная температура роста. Например, температурный режим клинических изолятов энтеробактерий ($>30^{\circ}\text{C}$) ограничивает накопление в культуре посторонней микрофлоры. При изучении структуры микробного сообщества получают накопительную культуру для выявления максимального количества представителей микроорганизмов. Температурный режим при этом — $10\text{--}20^{\circ}\text{C}$ в течение 23 сут. В дальнейшем микроорганизмы учитывают на селективных средах методом серийных разведений, который в сочетании с методом повторов дает статистически достоверное представление о микробном составе в природных образцах. Однако, если подобным образом легко выделять и учитывать представителей таких групп бактерий, как энтеробактерии, стрептококки или псевдомонады, то большинство микроорганизмов в природе относят к таковым, которые не культивируются в питательных средах [7—9].

Частично решает проблему выявления некультивируемых бактерий прямой учет микроорганизмов в суспензиях, почве, на поверхностях с применением различного рода микроскопической техники. Первый метод прямого микроскопического исследования микроорганизмов почвы был предложен Виноградским [6]. В тридцатые годы Холодный разработал метод стекол обрастания для исследования естественных ассоциаций микробов в почве, суть которого состоит в микроскопировании зафиксированных и окрашенных микробных обрастаний на стеклах, помещенных в почву [10]. Прижизненное микроскопирование микроорганизмов было предложено в лаборатории Перфильева, где использовали плоскопараллельные капилляры, помещенные в почву, — педоскопы [11]. С помощью педоскопов были обнаружены и описаны неизвестные ранее виды бактерий *Pedobacterium* и *Seliberia*. Прямой учет бактерий на мембранных фильтрах с помощью флюоресцентной микроскопии наиболее часто используется для быстрой количественной оценки водных микроорганизмов [12]. Новые возможности дало прямое электронно-микроскопическое наблюдение микроорганизмов почвы, позволившее выявить невидимые в световом микроскопе микроорганизмы [13].

Прямой учет микроорганизмов в природных образцах приемлем в том случае, если индивидуальный организм отличается морфологически от других представителей природной популяции, как, например, нитчатые бактерии. Метод прямой детекции микроорганизмов эффективен для получения информации относительно общего числа микробных клеток в образце. Но и в этом случае существует ограничение метода, поскольку он не дифференцирует живые и неживые клетки организмов.

Для идентификации микроорганизмов, не имеющих отличительных морфологических характеристик, традиционно использовали многочисленные трудоемкие дифференцированные тесты, учитывающие специфические физико-химические и иммунные свойства организма. Как правило, идентификация микроорганизмов с их помощью занимает много времени. Новые биофизические, биохимические и иммунохимические методы диагностики (электрофорез белков, определение профилей углеводов, липидов, серотипирование, типирование с помощью моноклональных антител и многие другие) позволяют довольно четко и быстро определить систематическое положение изолятов. Однако эти методы выявляют фенотипические признаки и, следовательно, не способны уловить незначительные генетические отличия, имеющие место внутри вида. Так, гены, образованные различными нуклеотидными последовательностями, могут кодировать ферменты, обуславливающие одинаковые фенотипы.

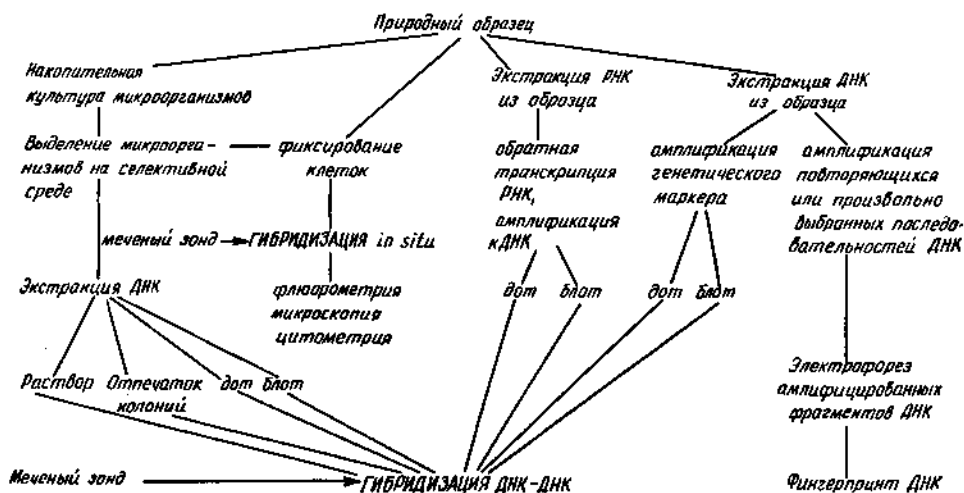
Использование метода полиморфизма ферментов определенного вида микроорганизмов с помощью электрофореза (см. [14]) было в свое время значительным прогрессом в сфере идентификации прокариот и позволило дифференцировать бактерии внутри вида. Суть метода состоит в том, что микроорганизмы различаются между собой по подвижности в электрическом поле водорастворимых ферментов, и это различие можно выявить с помощью белкового электрофореза. Молекулы ферментов имеют сеть электростатических зарядов, определяемую аминокислотной последовательностью, которая, в свою очередь, детерминирована специфическим генетическим локусом. Вариации специфических генов отражают изменение зарядов молекулы и, следовательно, оно проявляется в изменении подвижности белка (фермента).

Для выявления генетического родства между видами микроорганизмов широко использовали гибридизацию тотальной ДНК изолята с ДНК эталонного штамма, обнаруживающую степень дивергенции нуклеотидных последовательностей. Однако эта техника в том виде, в каком она использовалась ранее, не способна определить уровень генетических вариаций внутри вида. Относительно высокая ошибка эксперимента не дает возможности точно оценить генетическую связь близких штаммов. Кроме того, наличие внехромосомной ДНК как варибельного признака является источником ошибки в оценке генеалогических взаимосвязей. Тем не менее, техника гибридизации нуклеиновых кислот сыграла большую роль в разработке новой методологии идентификации микроорганизмов, так как дала начало созданию специфических зондов нуклеиновых кислот, позволяющих выявить в природных образцах как физиологически близкие группы микроорганизмов (деструкторы органических веществ, устойчивые к ионам тяжелых металлов), так и индивидуальные микроорганизмы. Гибридизация нуклеиновых кислот со специфическими зондами в природной среде подняла экологические исследования на качественно новый уровень, позволив отказаться от рутинной работы культивирования выделенных микроорганизмов и необходимости наработки ДНК традиционными методами.

Выявление микроорганизмов в окружающей среде молекулярно-биологическими методами. К началу 80-х гг. микробная экология исчерпала все возможности традиционных методов идентификации микроорганизмов в окружающей среде. Громоздкость и трудоемкость процессов культивирования микробов и выполнения дифференцированных тестов для их идентификации не соответствовали темпам развития науки, которые диктовали необходимость анализа сотен природных образцов в короткие промежутки времени. Туликовой оказалась ситуация с некультивируемыми бактериями: ухудшающаяся экологическая обстановка требовала мониторинга бактерий, имеющих эпидемиологическое значение, многие из которых либо труднокультивируемые, либо входящие в состояние некультивируемости вследствие попа-

дания в неблагоприятные условия окружающей среды. Особенно критическое положение создалось с генетически модифицированными микроорганизмами, сконструированными к тому времени для практического использования и требующими надежных методов мониторинга. Из-за отсутствия таких методов задерживалось их испытание в естественной среде обитания и применение в практике.

Новые быстрые методы идентификации бактерий в природных образцах (схема), методы изучения структуры и динамики популяций



в природном микробном сообществе создавались на основе достижений молекулярной биологии и генетики. Информация относительно структуры генов и их нуклеотидных последовательностей в сочетании с развитием новых методов молекулярной биологии дала возможность идентифицировать микроорганизмы в природных экосистемах с использованием генетических маркеров. Генетические маркеры представляют собой природные последовательности (ген, группа генов, повторяющиеся последовательности), гибридные последовательности, собранные из частей генов различных организмов, или синтетические паспортные последовательности, введенные в геном микроорганизма для его опознания в смешанной популяции.

Генетические маркеры, выявляющиеся у микроорганизмов с помощью анализа нуклеиновых кислот. Генетические маркеры условно можно разделить на две группы: одна из них выявляется фенотипически по экспрессии определенных генов. Это так называемые метаболические, или репортерные маркеры (*lasYZ*, *xylF*, *lux/luc* и др.). Другая группа маркеров идентифицируется генотипически путем анализа нуклеиновых кислот (НК) микроорганизмов. Это подразделение условно, так как генетические маркеры первой группы могут также идентифицироваться генотипически.

Использование зондов нуклеиновых кислот для идентификации организмов. Генотипически маркеры идентифицируются у микроорганизмов методами dot-, blot-гибридизации меченого зонда ДНК с тотальной ДНК или фракциями РНК либо гибридными зондами *in situ* меченого зонда ДНК с клетками бактерий. Зонд НК — последовательность нуклеотидов, одно- или двуцепочечная, меченная радиоизотопом (^{32}P , ^3H , ^{125}I) или конъюгированная с репортером (фермент, гаптен, биотин-авидин), который дает сигнал, регистрируемый прибором или визуально. В качестве зонда НК может служить хромосомная или плазмидная ДНК, индивидуальный ген или группа генов. Зонд НК выбирают в зависимости от поставленной задачи исследования: идентификации микроорганизмов до рода/вида, детекции функционально близких микроорганизмов, количественного учета прокариот. Для

энумерации бактерий используют неспецифические зонды ДНК, например, консервативные последовательности ДНК-матрицы рибосомной РНК (рДНК). Для обнаружения конкретного микроорганизма в природном образце конструируют строгоспецифический зонд на основе уникальной последовательности НК. Зонды ДНК клонируют в плаزمиды, нарабатывая их копии в клетках бактерий в больших количествах, или конструируют, синтезируя короткие олигонуклеотиды *de novo*.

Генетические маркеры могут быть локализованы в хромосоме микроорганизма или внехромосомной ДНК. Хромосомная локализация генетического маркера предпочтительнее, так как она обуславливает его стабильность в геноме микроорганизма. Кроме того, в случае прикладного использования ГММО для уменьшения риска миграции генетического маркера в микробном сообществе естественных экосистем (однако риск не исключается полностью) при мечении организма прибегают к введению маркера в его хромосому.

Внехромосомная ДНК имеет свойство сегрегировать при делении клеток, приводя к потере маркера в популяции, растущей без селективного давления, поэтому не рекомендуется использовать плазмиды для маркировки организмов, перспективных для применения в открытой системе. Однако в модельных экспериментах, проводимых в закрытых системах, рационально маркировать микроорганизмы репликативными плазмидами во избежание повреждения генетических локусов хромосомы.

Первые работы, в которых использовали зонды ДНК для идентификации индивидуальных микроорганизмов или группы функционально близких микроорганизмов, по-прежнему основывались на необходимости выделять живой организм на селективных средах и культивировать его для получения и анализа ДНК [18, 19, 21—28]. Серийные разведения накопительной культуры микроорганизмов или разведения природных образцов воды либо экстрактов почвы высевали на нитроцеллюлозные фильтры, которые помещали на селективные или неселективные питательные среды. Другая тактика предусматривала перенос изолированных на агаре колоний микроорганизмов на фильтр методом реплик. Выросшие или отпечатанные на фильтре колонии лизировали, освобожденную из клеток ДНК фиксировали и гибридизовали с меченным радиоактивным изотопом фосфора зондом ДНК [20]. После автордиографии фильтра идентифицировали колонии по полученному сигналу.

В качестве зонда ДНК поначалу использовали хромосомную ДНК известных бактерий, что позволило идентифицировать в микробных смесях представителей кишечной группы [21—24]. В дальнейшем исследователи пошли по пути создания более специфических зондов ДНК, беря за основу не хромосому, а специфические гены, локализованные на плазмиде и ответственные за функции деградации толуена [25], нафта [26], устойчивости к ионам ртути [27]. Указанные функции характерны для различных филогенетически отдаленных бактерий и не позволяют идентифицировать индивидуальные организмы, однако эти работы ценны тем, что дали начало анализу генетических вариаций в микробных популяциях. Метод гибридизации колоний с зондом, специфичным для транспозона $Tn5$, впервые был предложен для выявления генетически модифицированных бактерий в почве [28]. Эта работа инициировала исследования по мониторингу выживаемости бактерий в окружающей среде. В последние годы для детекции микроорганизмов в качестве зондов ДНК используют видо- и штаммоспецифические последовательности нуклеотидов [29, 30].

Гибридизация ДНК колоний со специфическим зондом позволяет в короткий срок идентифицировать микроорганизмы в микробных сообществах. Относительно высокая чувствительность метода (10^3 — 10^6 клеток в 1 г образца) позволила поднять молекулярно-экологические исследования на более высокий уровень, лишенный необходимости

выделения и наращивания бактерий для экстракции нуклеиновых кислот: их начали выделять непосредственно из природного образца.

Разработанные методы экстракции ДНК непосредственно из анализируемых образцов избавили специалистов от выполнения рутинной работы по выделению чистых культур микроорганизмов на селективных средах и наработки их для выделения ДНК, что значительно сокращает во времени процесс идентификации микроорганизмов в природных образцах. На этой стадии методология идентификации микроорганизмов дополнилась методом блот-гибридизации ДНК-ДНК по Саузерну.

Существуют два подхода к выделению ДНК из природного материала, содержащего микроорганизмы: прямой лизис клеток в образце и выделение клеток из образца с последующим лизисом. Оба подхода находятся в прямой зависимости от природы образца и способа анализа нуклеиновой кислоты (см. [32]). Выделение ДНК из водных образцов сводится к фильтрованию через мембрану, задерживающую микроорганизмы, определенного объема жидкости с последующей стадией лизиса клеток, задержанных фильтром, т. е. прямому лизису клеток микроорганизмов [33, 34]. Выделение ДНК из почвы и иловых отложений имеет свои сложности, поскольку присутствующие там гуминовые кислоты, ионы тяжелых металлов препятствуют активности ферментов, используемых для выделения и рестрикции ДНК. Впервые ДНК из почвы и ила была выделена Оргамом с соавт. [35] прямым лизисом клеток горячим раствором детергента или механическим разрушением их стеклянными шариками. ДНК осаждали этанолом и очищали хроматографически на гидроксипатите. Выделенная и очищенная таким способом ДНК была достаточно чистой для дот-гибридизации, однако она фрагментировалась в процессе выделения до размеров, меньших 10 тыс. п. н., что исключало ее использование для анализа Саузерн-гибридизацией. Обойти эту трудность удается при выделении ДНК из сепарированных от образца клеток.

Отделение клеток микроорганизмов от твердых частиц почвы производится многостадийным фракционным центрифугированием суспензии почвы в присутствии поливинилпирролидона, сорбирующего гуминовые кислоты. Таким способом получена высокомолекулярная чистая ДНК, пригодная для ДНК-ДНК Саузерн-гибридизации [36]. Недостатком этого метода является его трудоемкость и многостадийность, отбирающие много времени для анализа одной пробы. Более совершенные модификации метода выделения ДНК из почвы позволяют сократить стадии выделения бактериальных клеток до единственной [37—39]. Очистка сырого лизата клеток производится на колонке, заполненной Sephadex G-200 [38] или с помощью катионообменной смолы [39], что позволяет избежать ультрацентрифугирования ДНК в градиенте хлористого цезия. При выделении РНК из природных образцов, как и при выделении ДНК, необходимо освобождаться от органических примесей, препятствующих проведению последующих молекулярных процедур [40].

Полимеразная цепная реакция в экологических исследованиях. Чувствительность методов дот- и блот-гибридизации НК не всегда была достаточной для выявления микроорганизмов, присутствующих в пробах в малых количествах. Качественно новый период в микробной экологии начался с появлением в арсенале молекулярных методов исследования НК полимеразной цепной реакции (ПЦР) [41—44]. ПЦР позволяет значительно увеличить количество копий специфических последовательностей НК без культивирования микроорганизма, что усиливает чувствительность детекции НК, находящейся в образце в небольшом количестве.

Суть метода ПЦР состоит в плавлении ДНК и отжиге коротких олигонуклеотидных праймеров в районах, фланкирующих специфические последовательности. ДНК синтезируется в направлении от праймера к праймеру с помощью ДНК-полимеразы в присутствии смеси

четыре дезоксинуклеотидтрифосфатов (А, Г, Т, Ц). Образованный дуплекс ДНК снова плавится и процесс повторяется до накопления 2^n копий амплифицированной последовательности ДНК, где n — количество циклов плавления ДНК. ПЦР как метод исследования стала популярной благодаря использованию термостабильной полимеразы, выделенной из *Thermus aquaticus* (*Taq*), избавляющей от необходимости добавлять новую аликвоту полимеразы после каждого цикла плавления [43].

В экологических исследованиях ПЦР впервые была применена Стеффаном и Атласом [45] при амплификации специфических последовательностей гербицид-деградирующей бактерии *Pseudomonas seracia* АС1100 для выявления ее в сложных микробных популяциях в условиях микроэкосистемы. ПЦР усиливала чувствительность дот-гибридизации так, что в 100 г почвы можно было обнаружить 0,3 пг специфической ДНК (эквивалентной ДНК, выделенной из 100 клеток бактерий), т. е. 1 клетку в 1 г образца на фоне 10^9 немеченых клеток. Чувствительность метода детекции амплифицированных последовательностей ДНК в 10^3 раз превышала таковую метода дот-блот-анализа неамплифицированной последовательности. С того времени ПЦР надежно вошла в методологию детекции и идентификации микроорганизмов в природных образцах.

Использование метода ПЦР способствовало резкому всплеску экологических исследований, и за последние 5 лет проведено много изящных работ, которые невозможно проанализировать в рамках общего обзора. Кратко резюмируя, отметим следующие положения.

1. Несмотря на то, что методы гибридизации НК совершенствуются за счет новых возможностей (высокая специфичность зондов; использование повторяющихся последовательностей, усиливающих чувствительность метода из-за большого количества копий ДНК-мишени), ПЦР является базовой в большинстве новых методов детекции микроорганизмов в природных микробных сообществах как наиболее радикальное средство для достижения максимальной чувствительности методов.

2. Высокая чувствительность методов детекции микроорганизмов, в основе которых лежит ПЦР-амплификация узнаваемой последовательности НК, устраняет ограничение, связанное с идентификацией некультивируемых бактерий и бактерий, входящих в состояние некультивируемости [31, 46—49]. В настоящее время не составляет проблемы идентифицировать патогенные бактерии (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Vibrio*), присутствующие в небольших количествах в пищевых продуктах [30], почве, воде [31, 48], выделениях больных [49] и не выявляемые традиционными методами культивирования. Наличие специфических для многих видов некультивируемых бактерий зондов ДНК позволит в ближайшем будущем осуществлять бактериологический контроль за качеством пищевых продуктов, питьевой воды, повторно использующихся сточных вод в каждой экологической лаборатории и санитарной станции.

3. ПЦР-амплификация специфического генетического маркера ГММО является мощным инструментом для мониторинга их выживаемости в окружающей среде и контроля за их распространением в новых биоценозах [37, 50—52]. В ряде работ [37, 50] показано, что интродуцированные в микроэкосистемы ГММО с помощью ПЦР обнаруживались в них дольше, чем при использовании традиционных микробиологических методов. Предполагается, что в новых условиях ГММО входят в состояние некультивируемости. Ограничением метода является то, что выявленная амплифицированная последовательность НК не дает информации о жизнеспособности объекта на момент исследования, так как она может быть обнаружена в НК, освободившихся из клеток, функционировавших в прошлом, до отбора проб. Кроме того, специфический генетический маркер может быть естественным образом трансформирован в природной среде в клетки дру-

гого микроорганизма и исказить результаты при анализе образцов.

4. Метод ПЦР дает новые возможности для выявления активности ГММО в окружающей среде по анализу присутствия в природных образцах специфической мРНК, свидетельствующей об экспрессии генетического маркера. Если ранее в образцах ее обнаруживали гибридизацией с антисенс-РНК [53], то в настоящее время обратнотранскриптазная реакция в сочетании с ПЦР позволяет идентифицировать специфические транскрипты в тотальной РНК, выделенной непосредственно из образца, с помощью блот-гибридизации с зондом ДНК [37]. Подобная процедура анализа активности ГММО дает важную информацию об экспрессии хозяйственно ценных генов в природных условиях, а также открывает перспективу изучения влияния факторов окружающей среды на активность генов.

5. ПЦР имеет большой потенциал для исследования генетического разнообразия микробных популяций в природных экосистемах. Уже сделаны первые шаги в этом направлении. Идентифицированы вариации последовательности многих генов у природных изолятов бактерий [54]. Начаты работы по анализу генетической изменчивости в микробных популяциях, имеющих важные функции в окружающей среде [55]. В ближайшее время будет получена информация о распространении и вариабельности в природе генов, кодирующих функции азотфиксации, биodeградации, денитрификации и других микробных процессов.

Новые ПЦР-сочетанные методы идентификации микроорганизмов. Метод ПЦР, применяемый для детекции индивидуальных микроорганизмов или группы микроорганизмов в окружающей среде, предусматривает выбор специфических для гена или участка ДНК пар праймеров известной нуклеотидной последовательности. В 1990 г. одновременно две группы исследователей (Уилльямс с соавт. [56] и Уелш и Макклилланд [57]) предложили использовать ПЦР для получения фингерпринта бактериального генома с единственным праймером с произвольно выбранной (arbitrary) последовательностью. Так был предложен новый ПЦР-метод идентификации штаммов микроорганизмов, базирующийся на полиморфизме геномной ДНК.

Как отмечалось выше, ПЦР осуществляется при гибридизации коротких олигонуклеотидных праймеров с ДНК-мишенью в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и ДНК-полимеразы *Taq*. Обычно используют короткие последовательности (около 20 п. н.), абсолютно комплементарные специфической последовательности ДНК. Однако, если использовать праймеры, недостаточно комплементарные данному фрагменту ДНК, и проводить реакцию при относительно низкой температуре, то это обуславливает синтез ДНК в ряде локусов матрицы, имеющих полную или частичную гомологию с праймером, и результатом этой реакции будет образование серии дискретных фрагментов ДНК разных размеров. Количество и размер синтезированных фрагментов детерминированы последовательностью праймера и частотой распространения гомологичных ему последовательностей в геноме данного организма. Разделенные в геле агарозы фрагменты ДНК выглядят так, как код цены товара, использующийся в магазинах развитых стран. Это своеобразный код штамма микроорганизма. Преимуществом метода является то, что для ПЦР не нужны очищенные препараты ДНК, а последние могут быть получены при кипячении клеток, суспендированных в воде. За 3—4 ч можно проанализировать до 50 образцов в зависимости от марки термоциклера. Для идентификации микроорганизмов методом случайно амплифицирующейся полиморфной ДНК (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), описанным выше, не требуется знания нуклеотидных последовательностей ДНК. Применение метода RAPD для дифференцирования пяти видов *Staphylococcus* и внутривидовой диагностики *Streptococcus pyogenes* [57], *Lactobacillus lactis* [58], *Campylobacter* [59] помогло избежать более сложных молекулярно-биологических процедур.

В экологических исследованиях RAPD успешно использовали для идентификации высокоэффективного штамма *Bradyrhizobium japonicum* СВ 1809, интродуцированного в почвы Бразилии [60]. Следует отметить, что RAPD применяли в сочетании с другими эффективными методами идентификации, в частности, с методом пиролиза микроорганизмов и их анализа с помощью масс-спектрометрии, позволяющими дифференцировать микроорганизм по фенотипу (например, по изменению в продукции полисахаридов). Это обусловлено тем, что в окружающей среде исследуемый штамм бактерий может изменить свойства, к примеру, за счет замены одной пары нуклеотидов, которую невозможно было бы определить методом RAPD.

В последние 2—3 года получил распространение более совершенный, чем RAPD, метод идентификации микроорганизмов по профилям ПЦР-продуктов ДНК, гомологичных характерным повторам ДНК данного организма.

Прокариотический геном содержит многочисленные классы коротких повторяющихся последовательностей (см. [61]). Хотя функции этих последовательностей окончательно не известны, а механизм происхождения спекулятивен, они перспективны для разработки новых методов детекции и идентификации микроорганизмов в окружающей среде.

Важный подкласс этих элементов составляют повторяющиеся внегенные палиндромные последовательности (Repetitive Extragenic Palindromic, REP) и энтеробактериальные повторяющиеся межгенные консенсусы (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, ERIC). Вначале они были идентифицированы у энтеробактерий *E. coli* и *S. typhimurium* [62—65], а затем обнаружены у многих представителей эубактерий [66]. Эти повторяющиеся последовательности (ПП) содержат сильно консервативные инвертированные повторы и локализованы в межгенных нетранслирующихся участках хромосомы в количестве от 500 до 1000 копий. Высокая консервативность ПП побудила Версаловик с соавт. [66] создать праймеры, комплементарные консервативным участкам инвертированных повторов (18 п. н. для REP и 22 п. н. для ERIC), и амплифицировать с помощью ПЦР локусы генома бактерий, локализованные между REP- или двумя ERIC-элементами. Результатом этих реакций является образование наборов фрагментов ДНК характерной длины, разделенных в геле агарозы, которые отражают организацию генома данного организма. Метод идентификации микроорганизмов с помощью REP-ПЦР или ERIC-ПЦР очень эффективен, так как высокая специфичность праймеров позволяет различать бактерии на уровне штамма [67—69].

Кроме REP- и ERIC-повторов, для идентификации микроорганизмов могут быть использованы IS-подобные элементы [70] или последовательности, кодирующие рибосомную РНК.

Использование последовательностей рРНК для быстрой идентификации микроорганизмов. Одной из многообещающих является стратегия идентификации микроорганизмов в окружающей среде, предусматривающая использование для анализа последовательностей РНК или последовательностей ДНК, кодирующих рРНК. Преимущества этой стратегии огромны. Во-первых, в настоящее время в доступных банках данных хранятся последовательности рРНК для большинства известных микроорганизмов [71]. Компьютерный анализ этих последовательностей дает все новые возможности для разработки тактики применения их для диагностики микроорганизмов, что позволяет идентифицировать бактерии в смешанной популяции без необходимости их культивирования. Для этого определяют последовательности выделенных из природного материала 5S рРНК [72—74] или секвенируют диагностическую часть 16S РНК и сравнивают их с известными последовательностями [47, 75—77]. Такой подход связан с выполнением рутинной работы, однако он играет важную роль в идентификации некультивируемых микроорганизмов. Благодаря ему была обнаружена группа неизвестных ранее олиготрофных бактерий [75], идентифици-

рованы некультивируемые эндосимбионты червей [72], парамеций [47], расширено представление о микробном сообществе горячих источников [76]. Другая тактика предусматривает создание олигонуклеотидных зондов к рДНК или рРНК, исходя из известных последовательностей рРНК, и идентификацию микробной флоры дот-блот-гибридизацией ДНК *in situ* [78].

Во-вторых, последовательности рРНК естественным образом амплифицированы у прокариот, и каждая клетка содержит до 10^4 молекул рРНК. Это обстоятельство значительно усиливает чувствительность гибридизации рРНК-мишени со специфическим зондом по сравнению с гибридизацией ее ДНК-матрицы [79].

В-третьих, генетический локус рРНК прокариот имеет особенности строения, которые успешно используют для дифференциации микроорганизмов на уровне царства, рода, вида, штамма. У эубактерий он содержит гены, кодирующие три вида рРНК — 16S, 23S и 5S [80]. Для каждого вида рРНК известны консервативные последовательности, сохранившиеся у микроорганизмов в ходе эволюции и позволяющие определять их происхождение, а также устанавливать филогенетическое родство между ними. Кроме консервативных участков, одинаковых у филогенетически близких микробов, молекула рРНК имеет переменные последовательности, различающиеся внутри рода и вида и позволяющие дифференцировать микроорганизмы на уровне вида и штамма [81]. Осуществляется это созданием зондов, специфичных для переменной части рибосомной копии ДНК [82], или амплификацией переменной части рРНК [83]. Для амплификации последней пригодны праймеры, комплементарные консервативным участкам генов рРНК. Усовершенствованная методика использования ПЦР-амплифицированных фрагментов генов, кодирующих переменную часть 16S рРНК, может быть в ближайшем будущем успешно применена для идентификации микроорганизмов в смешанной культуре или сложных природных популяциях [83]. Техника основана на разделении указанных выше фрагментов ДНК одинаковой длины (выделенных из смеси неидентифицированных микроорганизмов) в денатурирующем градиентном геле (ДГГ). Электрофорез в ДГГ позволяет разделить в пространстве фрагменты ДНК одинаковой длины, но имеющие различную композицию последовательностей. В этом случае фрагменты рДНК различного происхождения будут давать в геле полосы разной длины. Гибридационный анализ с использованием специфических олигонуклеотидных зондов делает возможной идентификацию микробных компонентов популяции, которые в природе имеют, как правило, сложный состав. Эта техника впервые реально приблизила исследователей к анализу качественного состава микробов в сложном сообществе.

Другой особенностью строения генетического локуса рРНК является то, что его гены разделены спейсерами — некодирующими, но транскрибируемыми участками ДНК, которые различаются на уровне рода и вида микроорганизмов как по длине, так и по нуклеотидным последовательностям. Полиморфизм спейсеров используют для идентификации микроорганизмов на уровне рода и вида без предварительных диагностических тестов [84]. Для этого применяют две тактики: анализируют фингерпринт рестрикционных фрагментов рДНК, которые являются функцией размера спейсеров [85], или осуществляют ПЦР-амплификацию спейсеров, используя праймеры, комплементарные консервативным фланкирующим последовательностям (например, 16S и 23S) [84]. Полученные ПЦР-продукты различаются по длине и нуклеотидным последовательностям и используются для установления различий между микроорганизмами внутри вида. Эти продукты могут быть дополнительно проанализированы: подвергнуты рестрикционному анализу, прогибридизованы с зондом ДНК, комплементарным уникальной для конкретного организма последовательности, и т. д.

С анализом последовательностей рДНК тесно связан метод гибридизации ДНК *in situ*. Он основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов, меченных ^{32}P или флюорохромными красками, с генетическим маркером микроорганизма, фиксированного на специально обработанных стеклах. В качестве зондов для идентификации микроорганизмов часто используют родо-, видо- и штаммоспецифические последовательности рДНК. Метод допускает использование нескольких зондов, с помощью которых можно идентифицировать различные специфические последовательности конкретного организма, т. е. идентифицировать его по нескольким маркерам.

Это позволяет также четко выявлять специфический микроорганизм в смешанной микробной популяции. Преимущества этого метода состоят в том, что нет необходимости экстрагировать ДНК из клеток микроорганизмов, и вся процедура гибридизации занимает меньше 1 ч [71].

Меченые бактерии идентифицируют методом микроавторадиографии, если зонд мечен радиоизотопом [86], флюоресцентной микроскопии [87, 88] или цитометрии [89] в случае использования флюорохромоов.

Метод гибридизации ДНК *in situ* довольно перспективен для практического использования. Он может найти применение в быстрой медицинской диагностике патогенных микроорганизмов, включая таких медленно растущих микробов, как *Mycobacterium tuberculosis*. Используя несколько зондов, специфичных для различных микроорганизмов, можно не только идентифицировать возбудителей заболеваний, но и контролировать изменения в нормальной микрофлоре.

В экологических исследованиях гибридизация ДНК *in situ* может быть использована для мониторинга выживаемости организма, интродуцированного в качестве бактериального удобрения, биопестицида или мелиоранта, для контроля качества воды и загрязнения почв, для многих других целей. Выполнение анализов реально в полевых условиях с использованием портативного сканирующего флюорометра [72].

Репортерные генетические маркеры. Хромогенные генетические маркеры. Специфические микроорганизмы можно обнаружить по изменению окраски субстрата, на который они воздействуют. Гены утилизации лактозы *lacZY*: *lacZ* (β -галактозидаза) и *lacY* (пермеаза) дают возможность организму утилизировать лактозу в качестве источника углерода [90]. Если *Lac*⁺-бактерии инокулировать на агаризованную среду, содержащую хромогенный субстрат 5-хлоро-4-бromo-3-индолил- β -D-галактопиранозид (*X-gal*), β -галактозидаза расщепляет его, в результате чего меняется окраска колоний, легко идентифицируемых визуально по голубому цвету. Бактерии, имеющие *xylE* ген (катехол-2,3-диоксигеназа), превращают катехол в 2-гидроксимуконный семпальдегид, придающий желтую окраску среде [91]. Генетические маркеры *lacZY* и *xylE* удобно использовать для маркировки бактерий, которые изучают в модельных экспериментах [92]. Однако для мониторинга бактерий в окружающей среде маркировка генами *lacZY* неприемлема, так как многие микроорганизмы и растения содержат соответствующие гены.

Большой потенциал присущ GUS-маркеру, кодирующему β -глюкуронидазу. Воздействуя на флюорогенные субстраты (β -глюкурониды), β -глюкуронидаза конвертирует их в вещество, окрашивающее среду в цвет индиго. Эта цветовая конверсия дает возможность идентифицировать микроорганизмы на селективном агаре или цитохимически — в тканях растений [93]. Преимуществом GUS-системы как генетического маркера является то, что большинство бактерий, грибы, а также растения не имеют GUS-активности.

Кроме того, мониторинг *GusA*⁺-микроорганизмов возможен *in vitro* в процессе взаимодействия их с растением, без нарушения этого процесса [94].

Методы детекции микроорганизмов с помощью биолюминесценции. Среди репортерных генетических маркеров, экспрессия которых обнаруживается в живом организме визуально, особое место занимают гены биолюминесценции, имеющие прокариотическое (*lux*) или эукариотическое (*luc*) происхождение (см. [95]). Гены биолюминесценции *lux* придают бактериям свойство излучать видимый свет вследствие окисления длинноцепочечного алифатического альдегида под воздействием люциферазы: в присутствии восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH₂):



В природе люминесцентные бактерии известны среди представителей рода *Vibrio*, *Photobacterium*, *Xenorhabdus*, имеющих экологическую нишу в морской воде или в специальном органе нематод.

Бактериальная люцифераза является гетеродимером. Субъединицы α (40 тыс. п. н.) и β (37 тыс. п. н.) кодируются соответственно генами *luxA* и *luxB*. Для многих микроорганизмов определена первичная последовательность нуклеотидов этих генов. Это облегчает их выделение с помощью ПЦР, а благодаря гомологии позволяет выделять их методом рекомбинации *in vivo*. Однако существуют и различия между люциферазами различных бактерий; об этом свидетельствует хотя бы тот факт, что их люциферазам свойственна различная температурная чувствительность в *E. coli*. Так, люцифераза из *V. fischeri* стабильна в *E. coli* при 30 °С и быстро теряет активность при 37 °С, люцифераза из *V. harveyi* стабильна при 37 °С; люцифераза из *X. luminescens* — при 42 °С [95].

Генетическая организация люминесцентной системы имеет сходные черты у изученных бактерий. Люминесцентные бактерии содержат минимальный набор генов, необходимых для реакции излучения света и ее регуляции: *luxA* и *luxB* — структурные гены люциферазы и кодируют две ее субъединицы; *luxC*, *luxD* и *luxE* кодируют редуктазу жирных кислот, которая обеспечивает присутствие субстрата для люциферазы, а также регуляторные гены *luxR* и *luxI*. Выявлены также *lux*-гены, выполняющие неизвестные функции, которые различаются у представителей разных родов [100].

У большинства микроорганизмов существуют благоприятные внутренние условия для прохождения люциферазной реакции, а также реакции образования субстрата для люциферазы. В клетках синтезируются жирные кислоты, а также FMNH₂, присутствует молекулярный кислород, если бактерии имеют аэробное дыхание. Таким образом, для *E. coli* и многих других темновых организмов генов люциферазы *lux* (*A*, *B*) и редуктазы жирных кислот *lux* (*C*, *D*, *E*) достаточно для осуществления реакции выделения света.

Гены *lux* (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*) входят в состав одного оперона, т. е. транскрибируются в виде одной информационной РНК. Это удобно использовать при создании гибридных молекул для экспрессии этих генов. Подставляя их под тот или иной промотор, можно достичь желаемого уровня экспрессии при конститутивном или регулируемом синтезе транскрипта в зависимости от поставленной цели.

С того момента, как были клонированы *lux*-опероны *V. fischeri*, *V. harveyi* и *Ph. leiognathi*, их начали использовать при маркировке бактерий для наблюдения за ними в почве [101], воде [102], ризосфере растений [103], тканях растений [104]. Гены, участвующие в реакции биолюминесценции (кроме регуляторных генов), вводили в клетки бактерий с помощью репликативных плазмид [101—105] или доставляли в хромосому посредством транспозонов *Tn4431* [106], *Tn7* [107], *TnphoA* [105].

Для маркировки темновых бактерий часто применяют не весь оперон, а лишь структурные гены люциферазы (*luxA* и *luxB*). В этом случае для реакции биолюминесценции требуется экзогенный альдегид. Для этого используют такие длинноцепочечные альдегиды, как *n*-дека-

наль, тетрадеканаль и др. Бактерии при этом экспонируются в парах альдегида или люциферазный субстрат добавляют в жидкую культуру. Такой способ выявления бактерий имеет свои преимущества. Во-первых, минимальный фрагмент ДНК, содержащий последовательность генов двух субъединиц люциферазы, — сравнительно мал и составляет примерно 2 тыс. п. н. Это значительно облегчает конструкции (последовательность всего *lux*-кластера имеет размер до 7 тыс. п. н.). Во-вторых, при культивировании организмов, получивших *luxA* и *luxB*, процесс биолюминесценции не происходит до добавления субстрата и, таким образом, это не оказывает существенного влияния на функционирование клетки. Подобное влияние может быть значительным, о чем свидетельствует уравнение реакции биолюминесценции. В процессе эмиссии света используется молекулярный кислород, необходимый для аэробного дыхания клетки, а также FMNН₂, который наряду с другими соединениями является источником энергии. Это может сказываться на свойствах микроорганизмов и искажать результаты экспериментов. Присутствие же в клетке только структурных генов люциферазы не должно влиять на биохимические процессы клетки. При использовании указанных генов в качестве генетических маркеров создают, как правило, конститутивные конструкции для экспрессии этих генов [103—109], однако известны и индуцибельные *lux*-плазмиды [110, 111], применяющиеся для регулирования экспрессии *lux*-генов. В хромосому бактерий *luxA*- и *luxB*-гены доставляют с помощью транспозонов [112—114].

Для мониторинга бактерий в почве и воде в модельных экспериментах, кроме прокариотической биолюминесцентной системы, используют и эукариотическую. Эукариотическая люцифераза светлячка (*Photinus pyralis*) и жука-щелкуна (*Pyrophorus plagiophthalmus*) имеет одну субъединицу и осуществляет реакцию выделения света, окисляя люциферин в присутствии АТФ [115, 116]. Люциферазный ген светлячка был встроен в мини-*Tn5* под λ -промотор и введен в хромосому *Rhizobium meliloti* 1021 для наблюдения за выживаемостью бактерий в условиях, приближенных к естественным. В модельных экспериментах было продемонстрировано, что маркированный *luc*-генами штамм ризобий не отличался по выживаемости и по ростовым характеристикам от дикого типа бактерий [117].

Таким образом, биолюминесцентная система как генетический маркер, используемый для детекции микроорганизмов в окружающей среде, на данный период времени является наиболее перспективной. Из всех известных ныне молекулярно-генетических методов детекции микроорганизмов метод биолюминесценции остается наиболее дешевым, быстрым по получению результатов и доступным любой лаборатории, так как не требует сложной аппаратуры и материалов; высокая чувствительность метода позволяет наблюдать экспрессию *lux/luc*-генов у меченых бактерий визуально [102, 105, 118]. Огромным преимуществом метода является то, что мониторинг микроорганизмов, меченных *lux/luc*-генами, можно осуществлять в непрерывном процессе, не вмешиваясь в его ход. Гены биолюминесценции представляют собой безопасный для экологии естественный генетический материал, редко встречающийся в наземной части биосферы.

Появление этого метода будет способствовать проведению полевых испытаний ГММО и введению их в практику сельскохозяйственного производства. В 1991 г. группа американских исследователей получила разрешение на трехлетнее полевое испытание модифицированной с помощью *lux*-генов бактерии *Xanthomonas campestris* *pv.* *campestris* [119], а немецкие ученые в 1994 г. начинают испытание меченой *luc*-генами бактерии *R. meliloti* (личное сообщение).

Заключение. В последние годы в микробной экологии наметился постепенный переход от традиционных микробиологических методов исследования к молекулярно-биологическим. Новые методы идентификации микроорганизмов, основанные на анализе НК, позволяют быст-

по и надежно устанавливать систематическое положение природного изолята на уровне штамма без необходимости выделения его в чистой культуре. При детекции специфического микроорганизма ли ГММО в окружающей среде и наблюдении за его судьбой круг разработанных к настоящему времени молекулярно-биологических методов сужается, так как в случае большинства из них требуется специальное лабораторное оборудование для выделения и анализа НК. Это ограничивает возможность анализа большого количества образцов. Однако использование репортерных генетических маркеров для мечения микроорганизмов позволяет осуществлять их мониторинг в полевых условиях. Методы идентификации и детекции микроорганизмов постоянно совершенствуются как в направлении повышения их чувствительности и надежности, так и в отношении простоты их использования и удешевления.

Авторы благодарят Л. Бурьяновского за критическое прочтение обзора.

Н. О. Козировська, Г. Л. Ковтунович

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ І ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ У НАВКОЛИШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Резюме

Огляд літератури присвячено новим молекулярним методам детекції і ідентифікації мікроорганізмів у навколишньому середовищі. Обговорюються переваги нових методів перед традиційними.

N. Kozyrovska, G. Koutunovich

MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS OF DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN THE ENVIRONMENT

Summary

A review summarizes the literature data devoted to new molecular methods for detection and identification of microorganisms in the environment. The advantages of novel methods over conventional ones are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Watrud L. S., Perlak F. J., Tran M.-T. et al. Cloning of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* delta-endotoxin gene into *Pseudomonas fluorescens*: molecular biology and ecology of an engineered microbial pesticide // Engineered organisms in the environment: scientific tissues / Eds H. O. Halvorson, D. Pramer, M. Rogal.— Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1985.— P. 40—46.
2. Cannon F. C., Beynon J., Hankinson T. et al. Increasing biological fixation by genetic manipulation // Nitrogen fixation: hundred years after / Eds. H. Bothe, F. J. Bruijnde, W. E. Newton.— New York: Fisher, 1988.— P. 734—740.
3. Lindow S. E., Panopolous N. J. Field tests of recombinant Ice⁻ *Pseudomonas syringae* for biological frost control in potato // Release of genetically engineered microorganisms.— San Diego: Acad. press, 1988.— P. 121—131.
4. Shaw J. J., Dane F., Geiger D., Kloepper J. W. Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment // Appl. Environ. Microbiol.— 1992.— 58, N 2.— P. 267—273.
5. Maynard Smith J., Dowson C., Spratt B. Localized sex in bacteria // Nature.— 1991.— 349, N 6304.— P. 29—31.
6. Виноградский С. Н. Микробиология почвы. Проблемы и методы. Пятьдесят лет исследований.— М.: Изд-во АН СССР, 1952.— 792 с.
7. Ferguson R. L., Buckley E. N., Palumbo A. V. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement // Appl. Environ. Microbiol.— 1984.— 47, N 1.— P. 49—55.
8. Hoppe H.-G. Relationships between active bacteria and heterotrophic potential in the sea // Neth. J. Sea Res.— 1978.— 12.— P. 78—98.
9. Roszak D. B., Colwell R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment // Microbiol. Rev.— 1987.— 51.— P. 365—379.

10. Холодный Н. Г. Избранные труды в 3-х томах.— Киев: Изд-во АН СССР, 1957.— Т. 3.— 526 с.
11. Перфильев Б. В., Габеев Д. П. Капиллярные методы изучения микроорганизмов.— М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961.— 534 с.
12. Hall G. H., Jones I. G., Pickup R. W., Simon B. M. Methods to study the bacterial ecology of freshwater environments // Meth. Microbiol.— 1990.— 23.— P. 181—210.
13. Никитин Д. И., Васильева Л. В., Лохмачева В. А. Новые и редкие формы почвенных микроорганизмов.— М.: Наука, 1996.— 70 с.
14. Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics // Appl. Environ. Microbiol.— 1986.— 51, N 5.— P. 873—884.
15. Milkman R. Electrophoretic variations in *Escherichia coli* from natural sources // Science.— 1973.— 182, N 4116.— P. 1024—1026.
16. Young J. P. W. Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at the same site // J. Gen. Microbiol.— 1985.— 131.— P. 2399—2408.
17. Young J. P. W., Wexler M. Sym-plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum* // Ibid.— 1988.— 134.— P. 2731—2739.
18. Wortman A. T., Sommerville C. C., Colwell R. R. Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and applications of a chitinase probe // Appl. Environ. Microbiol.— 1986.— 52, N 1.— P. 142—145.
19. Morris J. G., Wright A. C., Roberts D. M. et al. Identification of environmental *Vibrio vulnificus* isolates with a DNA probe for the cytotoxin-hemolysin gene // Ibid.— 1987.— 53, N 1.— P. 193—195.
20. Grunstein M., Hogness D. S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1975.— 72, N 10.— P. 3961—3965.
21. Moseley S. L., Hug U., Alim A. R. M. A. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization // J. Infect. Dis.— 1980.— 142.— P. 892—898.
22. Hill W. E., Payne W. L., Ausilio C. C. G. Detection and enumeration of virulent *Yersinia enterocolitica* in food by DNA colony hybridization // Appl. Environ. Microbiol.— 1983.— 46, N 2.— P. 636—641.
23. Fitts R., Diamond M., Hamilton C., Neri M. DNA-DNA hybridization assay for the detection of *Salmonella* spp. in foods // Ibid.— N 4.— P. 1146—1151.
24. Bermudez M., Hazen T. C. Phenotypic and genotypic comparison of *Escherichia coli* from Pristine tropical waters // Ibid.— 1988.— 54, N 4.— P. 979—983.
25. Saylor G. S., Shields M. S., Tedford E. T. et al. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples // Ibid.— 1985.— 49, N 5.— P. 1295—1303.
26. Jain R. K., Saylor G. S., Wilson J. T. et al. Maintenance and stability of introduced genotypes in groundwater aquifer materials // Ibid.— 1987.— 53, N 3.— P. 996—1002.
27. Barkay T., Fouts D. L., Olson B. H. Preparation of a DNA gene probes for detection of mercury resistance genes in gram-negative bacterial communities // Ibid.— 1985.— 49, N 3.— P. 686—692.
28. Fredrickson J. K., Bezdichek D. F., Brockman F. J., Li S. W. Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by using a most probable number-DNA hybridization procedure and antibiotic resistance // Ibid.— 1988.— 54, N 2.— P. 446—453.
29. Lindstrom K., Hakola S., Kaitjalainen S. et al. Molecular tools for identification of *Rhizobium galegae* from cultures, root nodules and soil // New horizons in nitrogen fixation: Proc. of the 9th Int. Congr. on nitrogen fixation (Cancun, Mexico, December, 6—12, 1992) / Eds R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton.— New York: Kluwer Acad. publ., 1993.— 626 p.
30. Koch W. H., Payne W. L., Wentz B. A., Cebula T. A. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods // Appl. Environ. Microbiol.— 1993.— 59, N 2.— P. 556—560.
31. Tsai Y.-L., Palmer L. R., Sangermano L. R. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction // Ibid.— P. 353—357.
32. Trevors J. T. DNA extraction from soil // Microbial Releases.— 1992.— 1, N 1.— P. 3—9.
33. Sommerville C. C., Knight I. T., Straube W. L., Colwell R. R. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments // Appl. Environ. Microbiol.— 1989.— 55, N 3.— P. 548—554.
34. Furman J. A., Comeau D. E., Hastrom A., Chan A. M. Extraction from nature planktonic organisms of DNA suitable for molecular biological studies // Ibid.— 1988.— 54, N 3.— P. 1426—1429.
35. Orgam A., Saylor G. S., Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments // J. Microbiol. Meth.— 1987.— 7.— P. 57—66.
36. Holben W. E., Jansson J. K., Chelm B. K., Tiedje J. M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community // Appl. Environ. Microbiol.— 1988.— 54, N 3.— P. 703—711.
37. Selenska S., Klingmuller W. Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil // Microbial Releases.— 1992.— 1, N 1.— P. 41—47.
38. Tsai Y.-L., Olson B. H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments // Appl. Environ. Microbiol.— 1991.— 57, N 4.— P. 1070—1074.

39. Jacobsen C. S., Rasmussen O. F. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin // *Ibid.*—1992.—58, N 8.—P. 2458—2462.
40. Moran M. A., Torsvik V. L., Torsvik T., Hodson R. E. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies // *Ibid.*—1993.—59, N 3.—P. 915—918.
41. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science.*—1985.—230, N 4732.—P. 1350—1354.
42. Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences // *Ibid.*—1986.—233, N 4768.—P. 1076—1078.
43. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Ibid.*—1988.—239, N 4839.—P. 487—491.
44. Ou C. Y., Kwok S., Mitchell S. W. et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells // *Ibid.*—N 4837.—P. 292—295.
45. Steffan R. J., Atlas R. M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.*—1988.—54, N 2.—P. 311—314.
46. Brauns L. A., Hudson M. C., Oliver J. D. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells // *Ibid.*—1991.—57, N 8.—P. 2651—2655.
47. Amann R., Springer N., Ludwig W. et al. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts // *Nature.*—1991.—351, N 6322.—P. 161—164.
48. Islam M. S., Hasan M. K., Miah M. A. et al. Use of the polymerase chain reaction and fluorescent-antibody methods for detecting viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1 in laboratory microcosms // *Appl. Environ. Microbiol.*—1993.—59, N 2.—P. 536—540.
49. Way J. S., Josephson K. L., Pillai S. D. et al. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction // *Ibid.*—N 3.—P. 1473—1479.
50. Chaudhry G. R., Toranzos G. A., Bhatti A. R. Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment // *Ibid.*—1989.—55, N 5.—P. 1301—1304.
51. Amici A., Bazzicalupo M., Gallori E., Rollo F. Monitoring a genetically engineered bacterium in a fresh water environment by rapid enzymatic amplification of a synthetic DNA «number-plate» // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*—1991.—36.—P. 222—227.
52. Henschke R. B., Henschke E. J., Schmidt F. R. J. Monitoring survival and gene transfer in soil microcosms of recombinant *Escherichia coli* designed to represent an industrial production strain // *Ibid.*—35.—P. 247—252.
53. Pichard S. L., Paul H. J. Detection of gene expression genetically engineered microorganisms and natural phytoplankton populations in the marine environment by mRNA analysis // *Appl. Environ. Microbiol.*—1991.—57, N 5.—P. 1721—1727.
54. Herrick J. B., Madsen E. L., Batt C. A., Ghiorse W. C. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria // *Ibid.*—1993.—59, N 3.—P. 687—694.
55. Linne von Berg K. H., Bothe H. The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing // *FEMS Microb. Ecol.*—1992.—86, N 2.—P. 331—340.
56. Williams J. G. K., Kurelik A. R., Livak K. J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18, N 22.—P. 6531—6535.
57. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Ibid.*—N 24.—P. 7213—7218.
58. Cancilla M. R., Powell J. B., Hiller A. J., Davidson B. E. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrary primed polymerase chain reaction with 32 P and fluorescent labels // *Appl. Environ. Microbiol.*—1992.—58, N 5.—P. 1772—1775.
59. Mazurier S., Van de Giessen A., Hewelman K., Wernars K. Rapid analysis of *Campylobacter* isolates. DNA fingerprinting without the need to purify DNA // *Letl. Appl. Microbiol.*—1992.—11.—P. 260—262.
60. Neves M. C. P., Coutino H. L. C., Rumjanek N. G. et al. Genetic adaptation of *Bradyrhizobium japonicum* strains following naturalization into soil of the Brazilian Cerrados // *New horizons in nitrogen fixation: Proc. of the 9th Int. Congr. nitrogen fixation* (Cancun, Mexico, December, 6—12, 1992) / Eds R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton.—New York: Kluwer Acad. publ., 1993.—P. 735.
61. Lupski J. K., Wientsock G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes // *J. Bacteriol.*—1992.—174, N 14.—P. 4525—4529.
62. Stern M. J., Ames G., Smith N. H. et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome // *Cell.*—1984.—37, N 3.—P. 1015—1026.
63. Higgins C. F., McLaren R. S., Newbury S. F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and expression: evolution by gene conversion? A review // *Gene.*—1988.—72, N 1.—P. 3—14.

64. Sharples G. J., Lloyd R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 6503—6508.
65. Hulton C. S. J., Higgins C. F., Sharp P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria // Mol. Microbiol.—1991.—5.—P. 180—189.
66. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucl. Acids Res.—1991.—19.—P. 6823—6831.
67. De Bruijn F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenomic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* and other soil bacteria // Appl. Environ. Microbiol.—1992.—58, N 7.—P. 2180—2187.
68. Judd A. K., Schneider M., Sadowski M. J., de Bruijn F. J. Use of repetitive sequences and polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains // Ibid.—1993.—59, N 6.—P. 1702—1708.
69. Gressendorf B. A. J., van Belkum A., Koeken A. et al. Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by PCR fingerprinting // J. Clin. Microbiol.—1993.—31, N 6.—P. 1541—1546.
70. Waterhouse R. W., Glover L. A. Identification of prokaryotic repetitive DNA suitable for use as fingerprinting probes // Appl. Environ. Microbiol.—1993.—59, N 5.—P. 1391—1397.
71. Yurishuk R. J., Blick M., Bresser J. et al. Rapid *in situ* hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans* // Ibid.—1992.—58, N 8.—P. 2571—2578.
72. Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., Pace N. R. Analysis on hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences // Science.—1984.—224, N 4646.—P. 409—411.
73. Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., Pace N. R. Characterization a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences // Appl. Environ. Microbiol.—1985.—49, N 6.—P. 1379—1384.
74. Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J. The analysis on natural microbial populations by ribosomal RNA sequences // Adv. Microbiol. Ecol.—1986.—N 9.—P. 1—55.
75. Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L., Field K. G. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton // Nature.—1990.—345, N 6270.—P. 60—63.
76. Ward D. B., Weller R., Bateson M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community // Ibid.—P. 63—65.
77. Eardy B. D., Young J. P. W., Selander R. K. Phylogenetic position on *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes // Appl. Environ. Microbiol.—1992.—58, N 6.—P. 1809—1815.
78. Van Kuppeveld F. J. M., van der Logt J. T. M., Angullo A. F. et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification // Ibid.—N 8.—P. 2606—2615.
79. Angerer R. C., Angerer L. M. *In situ* hybridization to cellular RNAs // Genet. Eng.—1985.—N 7.—P. 43—65.
80. Woese C. R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev.—1987.—51.—P. 221—271.
81. Gray M. M., Sankoff D., Cedergren R. J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 14.—P. 5837—5852.
82. Leff L. G., Dana J. R., McArthur J. V., Shimkets L. J. Detection of Tn5-like sequences in kanamycin-resistant stream bacteria and environmental DNA // Appl. Environ. Microbiol.—1993.—59, N 2.—P. 417—421.
83. Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // Ibid.—N 3.—P. 695—700.
84. Jensen M. A., Webster J. A., Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms // Ibid.—P. 945—952.
85. Berthier Y., Verdier V., Guesdon J.-L. et al. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns // Ibid.—P. 851—859.
86. Giovannoni S. J., de Long E. F., Olsen G. J., Pace N. R. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells // J. Bacteriol.—1988.—170, N 3.—P. 720—726.
87. Aman R. J., Krumholz L., Stahl D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology // Ibid.—1990.—172, N 2.—P. 762—770.
88. De Long E. F., Wickham G. G., Pace N. R. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for identification of single cells // Science.—1989.—243, N 4896.—P. 1360—1363.

89. Amann R. J., Binder B. J., Olson R. J. et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56, N 6.—P. 1919—1925.
90. Drakos D. J., Hemming B. C., McPherson S. Tracking recombinant organisms in the environment: β -galactosidase as a selectable nonantibiotic marker for fluorescent pseudomonads // Biotechnology.—1986.—N 4.—P. 439—444.
91. Williams P. A., Murray K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (Arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid // J. Bacteriol.—1974.—125, N 2.—P. 416—423.
92. De Leij F. A. A. M., Bailey M. J., Whipps J. M., Lynch J. M. A simple most probable number technique for the sensitive recovery of a genetically-modified *Pseudomonas aureofaciens* from soil // Lett. Appl. Microbiol.—1993.—16.—P. 307—310.
93. Jefferson R. A. The GUS reporter gene system // Nature.—1989.—342, N 6252.—P. 835—837.
94. Couteadier Y., Daboussi M.-J., Eparvier A. et al. The GUS gene fusion system (*Escherichia coli* β -D-glucuronidase gene), a useful tool in studies of root colonization by *Fusarium oxysporum* // Appl. Environ. Microbiol.—1993.—59, N 6.—P. 1767—1773.
95. Stewart G. S. A. B., Williams P. lux-Genes and the application of bacterial bioluminescence // J. Gen. Microbiol.—1992.—138.—P. 1289—1300.
96. Engbrecht J., Nealson K., Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri* // Cell.—1983.—32.—P. 773—781.
97. Cohn D. N., Ogden R. C., Abelson J. N. et al. Cloning the *Vibrio harveyi* luciferase genes: use of synthetic oligonucleotide probe // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 1.—P. 120—123.
98. Птицын Л. П., Гуревич В. Б., Барсанова Т. Г. и др. Клонирование и инсерционный мутагенез фрагмента ДНК, кодирующего люминесцентную систему *Photobacterium leiognathi* // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1988.—№ 10.—С. 17.
99. DeLong E. F., Steinhauer D., Israel A., Nealson K. H. Isolation of the lux genes from *Photobacterium leiognathi* and expression in *Escherichia coli* // Gene.—1987.—54, N 1.—P. 203—210.
100. Merghen E. A. Molecular biology of bacterial bioluminescence // Microbiol. Rev.—1991.—51.—P. 123—142.
101. Rattray E. A. S., Prosser J., Killham K., Glover L. A. Luminescence-based nonextractive technique for *in situ* detection of *Escherichia coli* in soil // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56, N 11.—P. 3368—3474.
102. Heller S., Buhler S., Kitz S., Mieschendahl M. Bioluminescence-based detection of genetically engineered microorganisms in nonsterile river water // Microbial Releases.—1992.—1, N 1.—P. 35—39.
103. De Weger L. A., Dunbar P., Manafee W. F. et al. Use of bioluminescence markers to detect *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere // Appl. Environ. Microbiol.—1991.—57, N 12.—P. 3641—3644.
104. Shaw J. J., Kado C. J. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a non-disruptive manner // Biotechnology.—1986.—4, P. 560—564.
105. Kozzyrovska N., Alexeyev M., Kovtunovych G. et al. Bioluminescence-based detection of *Klebsiella oxytoca* VN13 in the environment // Biopolymery i klityna.—1994.—10, N 2.—P. 17—23.
106. Shaw J. J., Kado C. J. Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a non-pathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity // Mol. Plant-Microbe Interact.—1978.—1.—P. 39—45.
107. Hao Chen, Gold S. E., Tamaki S. J., Keen N. T. Construction of a Tn7-lux system for gene expression studies in gram-negative bacteria // Gene.—1992.—12, N 1.—P. 27—34.
108. Legocki R. P., Legocki M., Baldwin T. O., Szalay A. A. Bioluminescence in soybean root nodules: demonstration of a general approach to assay gene expression *in vitro* by using bacterial luciferase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 23.—P. 9080—9084.
109. Silcock D. J., Waterhouse R. N., Glover L. et al. Detection of a single genetically modified bacterial cell in soil by using charge couple device-enhanced microscopy // Appl. Environ. Microbiol.—1992.—58, N 8.—P. 2444—2448.
110. King J. M. H., Digrazia P. M., Applegate B. et al. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation // Science.—1990.—249, N 4970.—P. 778—781.
111. O'Kane D. J., Linjle W. L., Wampler J. E. et al. Visualization of bioluminescence as a marker of gene expression in *Rhizobium* infected soybean root nodules // Plant Mol. Biol.—1988.—10.—P. 387—399.
112. Boivin R., Chalifour F. P., Dion P. Construction of a Tn5 derivative encoding bioluminescence and its introduction in *Pseudomonas*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* // Mol. and Gen. Genet.—1988.—213, N 1.—P. 50—55.
113. De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K. N. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of

- cloned DNA in gram-negative eubacteria // J. Bacteriol.—1990.—172, N 11.— P. 6568—6572.
14. *Wolk C. P., Cai Y., Panoff J.-M.* Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88, N 12.— P. 5355—5359.
 15. *De Wet J. R., Wood K., Helinski D., De Luca M.* Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli* // Ibid.—1985.—82, N 4.— P. 7870—7873.
 16. *Wood K., Amy Lam Y., Seliger H. H., McElroy W.* Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors // Science.—1989.—244, N 4905.— P. 700—702.
 17. *Cebolla A., Ruiz-Berraquero F., Palomares A. J.* Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring // Appl. Environ. Microbiol.—1993.—59, N 8.— P. 2511—2519.
 18. *Cebolla A., Ruiz-Berraquero F., Palomares A. J.* Expression and quantification of firefly luciferase under control of *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters // J. Bioluminescence and Chemiluminescence.—1992.—6, N 3.— P. 177—184.
 19. *Shaw J. J., Beauchamp C., Dane F., Kriel R. L.* Securing a permit from the United States Department of Agriculture for field work with genetically engineered microbes: a non-prohibitory process // Microbial Releases.—1992.—1, N 1.— P. 51—53.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев

Получено 23.02.94