

УДК: 577.29+615.838.7

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
ESCHERICHIA COLI И *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* НА ОСНОВЕ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМ
В СТРУКТУРЕ ЛЕЧЕБНОЙ ГРЯЗИ**

С.В. РОГАТЫХ*, И.А. КОФИАДИ**, С.В. МУРАДОВ*

* *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-исследовательский геотехнологический центр Дальневосточного отделения Российской академии наук, Северо-восточное шоссе, 30, Петропавловск-Камчатский, 683002, Россия, e-mail: biolab@kscnet.ru*

** *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России, Каширское шоссе, 24/2, Москва, 115478, Россия, e-mail: biolab@kscnet.ru.*

Аннотация. Приводятся данные о разработке комплекса качественных тест-систем на основе полимеразной цепной реакции для установления качественного и количественного состава сообществ микроорганизмов. Целью исследования являлось создание ПЦР-тест-систем для детекции видоспецифичных фрагментов гена 16S рРНК санитарно-показательных микроорганизмов лечебной грязи месторождения озера Утиное (полуостров Камчатка). Проведена оценка эффективности нескольких методов очистки ДНК в отношении представителей санитарно-показательных микроорганизмов. Протестированы методики очистки ДНК, использующие различные комбинации химических (обработка *GuSCN* и *CTAB*) воздействий на клетки. Оценка эффективности проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Приводятся данные о качественном соотношении санитарно-показательных микроорганизмов *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* в исходной пробе лечебной грязи и в пробе, подвергавшейся длительной экологической активации. В исходной лечебной грязи обнаружены бактерии *E. coli* и *C. perfringens*, в активированной лечебной грязи бактерии *C. perfringens* не обнаружены, бактерии *E. coli* – в незначительном количестве. Эти данные подтверждаются ранее проведенными микробиологическими исследованиями проб на содержание бактерий *E. coli* и *C. perfringens*. Разработанная модификация метода позволяет на уровне ДНК устанавливать минимальную загрязненность грязе-лечебного месторождения санитарно-показательными микроорганизмами.

Ключевые слова: лечебная грязь, бактериостатичность, полимеразная цепная реакция, антибактериальность.

**IDENTIFICATION OF SANITARY INDICATORS MICROORGANISMS *ESCHERICHIA COLI*
AND *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BASED PCR-TEST SYSTEMS IN THE STRUCTURE
OF THERAPEUTIC MUD**

S.V. ROGATYKH*, I.A. KOFIADI**, S.V. MURADOV*

* *Scientific Research Geotechnological Center Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Severo-Vostochnoe sh., 30, Petropavlovsk-Kamchatskiy, 683002, Russia, e-mail: biolab@kscnet.ru*

** *National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical and Biological Agency of Kashirskoe sh., 24/2, Moscow, 115478, Russia, e-mail: biolab@kscnet.ru*

Abstract. This article presents the data on the development of a set of high-quality test systems based on the polymerase chain reaction to determine the qualitative and quantitative composition of microbial communities. The research purpose was to develop PCR-test systems for the detection of species-specific 16S rRNA gene fragments sanitary indicator microorganisms therapeutic mud deposits Lake Utinoye (Kamchatka peninsula). Assessment the effectiveness of several methods of DNA purification for the representatives of sanitary indicator microorganisms was carried out. The authors tested the methods of DNA purification using various combinations of chemical (processing *GuSCN* and *CTAB*) effects on cells. Evaluation of efficacy was performed by real-time PCR. The data on the ratio of quality sanitary indicator microorganisms *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in the original sample curative mud and the sample was subjected to long-term environmental activation. In the initial therapeutic mud it was found *E. coli* and *C. perfringens*, in activated therapeutic mud - *C. perfringens*, the *E. coli* – in small quantities. These findings are supported by previous microbiological testing of samples for the content of *E. coli* and *C. perfringens*. Developed modification of the method allows to set a minimum level of DNA contaminated with fields of the therapeutic mud of sanitary indicators microorganisms.

Key words: therapeutic mud, bacteria statics, polymerase chain reaction, antibacteria.

Использование гена 16S рРНК в качестве эволюционного маркера у бактерий послужило значительному развитию представлений в области экологии микроорганизмов [11]. Анализ данного гена, основанный на *полимеразной цепной реакции* (ПЦР), широко применяется при характеристике сообществ почвенных бактерий и архей, установлении их роли в формировании субстратов, а также определении особенностей их метаболизма и жизненного цикла [9]. Важным преимуществом метода ПЦР является возможность проведения молекулярного анализа напрямую из естественной среды обитания микроорганизмов, минуя этап культивирования.

Наиболее значимым прорывом в развитии технологии ПЦР с момента ее открытия в 1985 году принято считать разработку модификации метода, основанную на использовании флуоресцентных красителей в качестве маркера, отражающего накопление продуктов ПЦР. Данный подход открыл широкие возможности в области количественного анализа нуклеиновых кислот. В свою очередь исключительная чувствительность метода позволяет детектировать единичные копии молекул даже в сложных смесях нуклеиновых кислот, что делает его максимально приспособленным для решения поставленных в настоящем исследовании задач.

Целью работы являлось адаптация ПЦР-тест-систем для детекции видоспецифичных фрагментов гена 16S рРНК санитарно-показательных микроорганизмов лечебной грязи месторождения озера Утиное Камчатского края. В настоящее время лечебная грязь имеет большую ценность как признанное высокоэффективное природное лечебное средство. Практическое применение лечебной грязи определяет необходимость контроля всех составляющих параметров экологии столь сложного субстрата, зависящего от условий формирования [5].

В результате наблюдений за динамикой изменений санитарно-микробиологических показателей лечебной грязи озера Утиное [2] было установлено несоответствие нормативам содержания условно-патогенной (*Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*) флоры (при отсутствии патогенных микроорганизмов в грязевых отложениях и покровных водах месторождения). Специфическая иловая микрофлора лечебной грязи отличается разнообразием и достаточной численностью, но очистительная способность лечебной грязи озера снижена в связи с техногенным влиянием эксплуатации Нижне-Паратунского геотермального месторождения. Разработанный ранее нами метод экологической активации лечебной грязи обеспечивает быстрое очищение от привнесенных санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов различных систематических групп [2, 3].

Озеро Утиное расположено в 1,5 км на север от пос. Паратунка Елизовского района Камчатского края, имеет неправильную форму с глубоко вдающимися в берега заливами. Пробы лечебной грязи отбирались с глубины отбора стерильной лопаткой в специальную упаковку из полимерного материала при отсутствии видимых источников загрязнения. Исследовались пробы грязевого раствора в исходной (озерной) грязи и активированной в аэробных и анаэробных условиях.

При обработке *GuSCN* осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (5,25 М *GuSCN*, 50 мМ трис, pH 6,4, 20 мМ ЭДТА, 1,3%-ный тритон), инкубировали в течение 30 мин при 65°C [1]. При обработке СТАВ ресуспендировали 1 г субстрата в 500 мкл лизирующего буфера, содержащего 100 мМ *Tris-HCl*, 100 мМ *EDTA*, 1,5 М *NaCl*, 1% СТАВ. Тщательно гомогенизировали образец на вортексе. Затем термостатировали пробирку при 65°C в течение 5 мин. После этапа лизиса проводили очистку от ингибиторов с помощью стандартной методики фенол-хлороформной экстракции [7]. После преципитации ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-*HCl* pH 8,6, 1 мМ ЭДТА).

При проведении ПЦР использовали пару универсальных праймеров *upr2-d* (3'TGCATGGCYGTCGTCAGCTCGT5') и *upr3-r* (3'TGACGGGCGGTGTGTRCAAGG5'), позволяющих амплифицировать суммарную ДНК в пробе [4]. ПЦР проводили по следующей программе: 94°C – 10 с, 70°C – 20 с, 72°C – 10 с в течение 40 циклов, с измерением флуоресценции при 70°C.

В связи с вышесказанным, нами разработаны последовательности олигонуклеотидов (праймеров) для проведения качественного и количественного анализа санитарно-показательных микроорганизмов *E. coli* и *C. perfringens*. В общей сложности проанализировано 158 референтных последовательностей, в том числе 146 для *E. coli* и 12 для *C. perfringens*. С помощью программы *Oligo* 6.0 подобраны пары праймеров с учетом формирования вторичных структур и димеров. Выбранные пары праймеров, соответствующие гипервариабельным участкам *V3* и *V4* гена 16S рРНК, были проверены на специфичность относительно 5000 соответствующих последовательностей бактерий и архей. В соответствии с референтной последовательностью *E. coli* [10] координаты выбранных фрагментов определены 338-534 и 515-700 позициями нуклеотидной цепи соответственно.

Проверку работоспособности тест-систем осуществляли с использованием плазмид, содержащих специфическую вставку *E. coli* и *C. perfringens*. По результатам проверки получены данные, свидетельствующие о работоспособности разработанных тест-систем. Заключение о специфичности разработанных пар праймеров сделано на основании анализа последовательностей, содержащихся в базах *Gen Bank* и *Ribosomal Database Project (RDP)* [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank, 8].

Одним из основных ограничений при молекулярно-генетическом анализе сообществ почвенных микроорганизмов является наличие ингибиторов ПЦР в образцах. Так, например, недостаточная очистка от ингибиторов (гуминовых кислот или ионов железа, содержащихся в средах для выращивания ацидофильных микроорганизмов) оказывает влияние на эффективность работы *Taq*-полимеразы и приводит к искажению результатов количественной ПЦР. Кроме того, смешанные сообщества могут содержать микроорганизмы из различных таксономических групп, обладающих различной устойчивостью к воздействию лизирующих агентов. Так, например, из-за особенностей строения клеточной стенки, грамотрицательные клетки разрушаются легче, чем грамположительные, что приводит к изменению исходного соотношения различных типов нуклеиновых кислот и, как следствие, к некорректным результатам [6].

Таким образом, метод очистки ДНК должен отвечать двум условиям: эффективно удалять ингибиторы из препарата ДНК и обуславливать максимальную репрезентативность нуклеиновых кислот. Исходя из полученных ранее данных [4], к сравнению были выбраны два метода очистки ДНК, основанные на лизирующем действии *гуанидин изотиоцианата (GuSCN)* и *гексадецил триметиламмония бромида (СТАВ)*.

Анализ эффективности методов очистки ДНК проводили на образцах грязевого субстрата с озера Утиное методом ПЦР в реальном времени. Визуализацию накопления продукта реакции осуществляли с помощью интеркалирующего красителя *SYBR Green* (рис. 1).

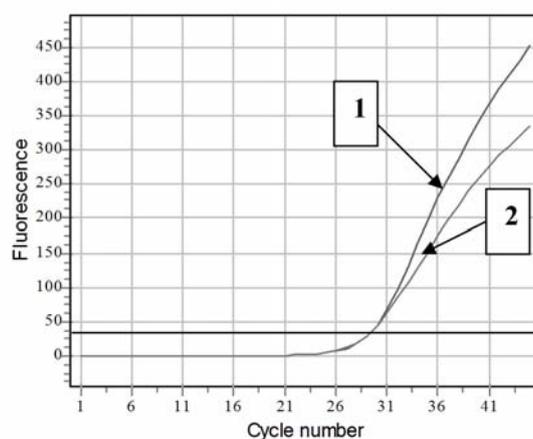


Рис. 1. Протокол ПЦР-анализа с результатами сравнения методов очистки ДНК: 1 – метод, основанный на лизирующей активности *GuSCN*, 2 – метод, основанный на лизирующей активности СТАВ

Оба подхода к очистке ДНК продемонстрировали сходную эффективность, однако предпочтение было отдано сравнительно более простому методу, основанному на лизирующем действии СТАВ.

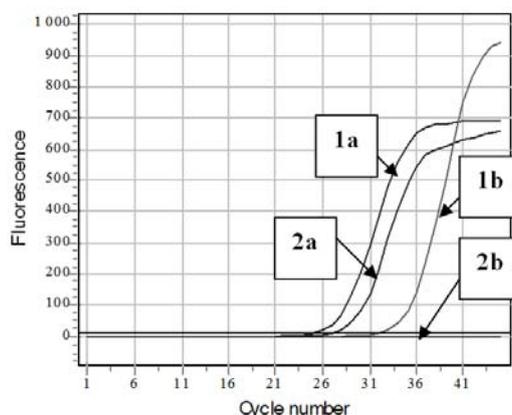


Рис. 2. Протокол ПЦР-анализа с результатами анализа проб № 1 и № 2 грязевого субстрата на наличие бактерий *E.coli* (a) и *C. perfringens* (b)

С помощью разработанной методики очистки ДНК был проведен ПЦР-анализ двух проб лечебной грязи: исходной (№ 1) и подвергавшейся длительной активации (№ 2). *pH* пробы № 1 слабнокислый, *pH*

пробы № 2 выраженноокислый. Визуализацию накопления продукта реакции осуществляли с помощью интеркалирующего красителя *SYBR Green*. Результаты исследования приведены на рис. 2. В результате проведенных исследований в пробе № 1 (исходная лечебная грязь) обнаружены бактерии *E.coli* и *C. perfringens*, в пробе № 2 (активированная лечебная грязь) бактерии *C. perfringens* не обнаружены, бактерии *E.coli* – в незначительном количестве. Эти данные подтверждаются микробиологическими исследованиями проб на содержание бактерий *E.coli* и *C. perfringens* [3].

Нами разработана модификация метода с применением молекулярно-биологических подходов, позволяющая на уровне ДНК устанавливать минимальную загрязненность месторождения озера Утиное санитарно-показательными микроорганизмами. Акватория озера Утиное является месторождением лечебной грязи с высокими кондициями по физико-химическим параметрам, содержанию разнообразной и достаточной по численности микрофлоры лечебной грязи. Особая ценность этого месторождения заключается и в том, что это единственное разведанное месторождение лечебной грязи в Камчатском крае, на базе которого планируется создание курорта федерального значения «Паратунка» с целью обеспечения нарастающего спроса на восстановительное лечение, что является тенденцией развития современного российского здравоохранения. В дальнейшем планируется работа по созданию комплекса ПЦР-тест-систем для определения семейств лидирующих микроорганизмов, специфичных для лечебных грязей озера Утиное, в том числе: *Bacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Nitrobacteriaceae*, *Clostridium*, *Chromathiaceae*, *Thiobacillaceae*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Hydrogenbacteriaceae*, *Siderocapsaceae*, *Hyphomicrobiales*, *Spirochaetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetales*.

Литература

1. Данилевич В.Н., Гришин Е.В. Способ выделения геномной ДНК из клеток микроорганизмов. Патент РФ № 2177035. 2001.
2. Мурадов С.В. Экологическое решение проблем современного грязелечения. Петропавловск-Камчатский: КамГУ им. В. Беринга, 2007. 266 с.
3. Мурадов С.В. Микробиологические свойства и биомедицинское тестирование пелоидных препаратов из активированной лечебной грязи // Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. 20, № 4. С. 38–41.
4. Рогатых С.В., Докшукина А.А., Хайнасова Т.С., Мурадов С.В., Кофиади И.А. Использование технологии ПЦР в реальном времени для оценки эффективности методов выделения ДНК из культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 2. С. 226–230.
5. Хадарцев А.А., Платонов В.В., Фридзон К.Я., Чуносков С.Н. Химический состав и биологическая активность сапропеля оз. Глубокое (Татарстан) // Вестник новых медицинских технологий. 2014. № 3. С. 199–204.
6. Хадарцев А.А., Платонов В.В., Елисеев Д.Н., Швыкин А.Ю., Хрупачев А.Г. Метод предварительной оценки физиологической активности гуминовых и гумино-подобных веществ // Вестник новых медицинских технологий. 2010. № 3. С. 26–28.
7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162, № 1. P. 156–159.
8. Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 141–145.
9. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products // Chemistry & Biology. 1998. № 5. P. 245–249.
10. Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB // Nucleic Acids Research. 2007. №35(21). P. 7188–7196.
11. Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiological Reviews. 1987. V. 51, № 2. P. 221–271.

References

1. Danilevich VN, Grishin EV, inventors. Sposob vydeleniya genomnoy DNK iz kletok mikroorganizmov [A method of isolating genomic DNA from bacterial cells]. Russian Federation patent RU № 2177035; 2001. Russian.
2. Muradov SV. Ekologicheskoe reshenie problem sovremennogo gryazelecheniya [Ecological solution to the problems of modern mud]. Petropavlovsk-Kamchatskiy: KamGU im. V. Beringa; 2007. Russian.

3. Muradov SV. Mikrobiologicheskie svoystva i biomeditsinskoe testirovanie peloidnykh preparatov iz aktivirovannoy lechebnoy gryazi [Microbiological properties and biomedical testing peloid preparations of an activated therapeutic mud]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2013;20(4):38-41. Russian.
4. Rogatykh SV, Dokshukina AA, Khaynasova TS, Muradov SV, Kofiadi IA. Ispol'zovanie tekhnologii PTsR v real'nom vremeni dlya otsenki effektivnosti metodov vydeleniya DNK iz kul'tur atsidofil'nykh khemolitotrofnyykh mikroorganizmov [The use of PCR technology in real time to assess the effectiveness of the methods of DNA extraction from cultures acidophilus microorganisms Chemolithotrophic]. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2011;47(2):226-30. Russian.
5. Khadartsev AA, Platonov VV, Fridzon KY, Chunosov SN. Khimicheskiy sostav i biologicheskaya aktivnost' sapropelya oz. Glubokoe (Tatarstan) [The chemical composition and biological activity of sapropel lake. Deep (Tatarstan)]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2014;3:199-204. Russian.
6. Khadartsev AA, Platonov VV, Eliseev DN, Shvykin AY, Khrupachev AG. Metod predvaritel'noy otsenki fiziologicheskoy aktivnosti guminovykh i gumino-podobnykh veshchestv [Preliminary evaluation method of physiological activity of humic and humic-like substances]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2010;3:26-8. Russian.
7. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987;162(1):156-9.
8. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucl. Acids Res. 2009;37:141-5.
9. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology. 1998;5:245-9.
10. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research. 2007;21:7188-96.
11. Woese C.R. Bacterial evolution. Microbiological Reviews. 1987;51(2):221-71.

Библиографическая ссылка:

Рогатых С.В., Кофиади И.А., Мурадов С.С. Идентификация санитарно-показательных микроорганизмов *Escherichia Coli* и *Clostridium Perfringens* на основе ПЦР-тест-систем в структуре лечебной грязи // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №4. Публикация 7-4. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/7-4.pdf> (дата обращения: 23.11.2016).