

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ РІЗНОМАНІТТЯ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Я.В. Чабанюк

*Інститут агроекології і природокористування НААН*

*Існує широкий спектр молекулярно-генетичних методів вивчення мікробного різноманіття ґрунту, кожен з яких надає можливість розглянути лише один із його аспектів. Найповнішу інформацію можна отримати за використання широкого спектра цих методів, що забезпечить глобальну оцінку різноманіття, таксономічної структури мікробного угруповання ґрунту та біоценотичних функцій, які воно виконує. У наведеному огляді висвітлено низку молекулярних методів, що найчастіше використовуються у вивченні мікробного різноманіття ґрунту.*

**Ключові слова:** біорізноманіття, мікроорганізми, ґрунт, ДНК, молекулярні методи.

Якість ґрунту визначається його здатністю функціонувати як життєво важлива біокосна компонента екосистеми, а в межах сільськогосподарського землекористування – підтримувати біологічну продуктивність, не погіршувати збалансованість навколишнього природного середовища, і саме цим підтримувати необхідний стан рослин, тварин і здоров'я людини (Dogan et al., 1997). Мікроорганізми завдяки великій динамічності ферментативних систем, більше ніж будь-які інші організми, характеризуються здатністю адаптуватись до мінливих умов і мобільно реагувати на зміни у навколишньому природному середовищі (Hargreaves et al., 2003). Тому визначення характеристик їх біорізноманіття та активності використовують для контролю екологічного стану ґрунту (Yakovchenko et al., 1996). Зокрема, вимірювання мікробної активності включено у перелік заходів біоіндикації у багатьох національних та міжнародних програмах моніторингу якості ґрунту. Найважливішими критеріями для біоіндикатора є чутливість і швидке реагування на забруднення навколишнього природного середовища (Holloway et al., 1991).

Під час аналізу стану ґрунту найбільшу увагу приділяють мікроорганізмам – грибам і бактеріям, адже вони найважливіші

щодо забезпечення наземних організмів і екосистем в цілому енергією і поживними речовинами (Richards, 1987). Гриби і бактерії домінують у біомасі ґрунту, найчастіше – мікроскопічні гриби. Мікробна біомаса складається із «сплячих» і метаболічно-активних організмів. Проте прямі та непрямі біохімічні методи, які нині використовуються для оцінки біомаси, не є належним чином перевірені і надійні для поділу цих фракцій. Було висловлено припущення, що склад мікробної біомаси є комплексним сигналом екологічних змін, оскільки мікроорганізми є однією із фракцій органічної речовини ґрунту, біоценотично значущої, чутливої до забруднення навколишнього природного середовища (Powlson, 1994).

Із збільшенням застосування молекулярно-генетичних методів у мікробній екології стало очевидним, що мікробіологам була відома лише дуже мала частина видів існуючого різноманіття мікроорганізмів. Більшість невідомих мікроорганізмів є некультивованими видами бактерій. Із застосуванням молекулярно-генетичних методів було виявлено, що в 1 г ґрунту може існувати близько 4000 видів бактерій як «геномних одиниць» (Torsvik et al., 1990). Але всього відомо та описано 5000 видів бактерій, що трапляються в ґрунтах (Pace, 1999), і лише 1% бактеріальних видів можна виділити у чисту культуру

на поживних середовищах та культивувати їх із застосуванням стандартних лабораторних методів. Науковцями висловлено сумнів – чи цей культивований 1% видів є представниками бактерій саме ґрунту (Torsvik et al., 1998)?

Застосування молекулярно-генетичних методів з вивчення біорізноманіття мікроорганізмів, що швидко розвивається впродовж останніх років, дають можливість розв'язати багато проблем під час проведення досліджень традиційними культуральними методами. Отже, в багатьох природних середовищах існування різноманіття мікробних угруповань (Curtis et al., 2004; Dunbar et al., 2002) їх просторова і тимчасова неоднорідність (Green et al., 2004; Horner-Devine et al., 2004; Nicol et al., 2003] є набагато більшою, ніж вважалось раніше.

Низка молекулярно-генетичних методів з вивчення біорізноманіття мікробних асоціацій включає реасоціації ДНК, ДНК-ДНК і РНК: ДНК-гібридизацію, клонування і секвенування ДНК та інші методи, що походять від полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), а саме: денатуруючий градієнт гель-електрофорез DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), температурний градієнт гель-електрофорез TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), аналіз рибосомального міжгенного спейсеру RISA (ribosomal intergenic spacer analysis) та автоматизований аналіз рибосомального міжгенного спейсеру ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis).

**1. Визначення вмісту цитозин-гуаніну (G+C).** Визначення відсоткового вмісту суми гуаніну та цитозину у ДНК різних мікроорганізмів використовують для вивчення бактеріальних угруповань ґрунту та ідентифікації (Nusslein et al., 1999), адже таксономічно-родинні групи і види розрізняються між собою за цією ознакою на 3–5% (Tiedje et al., 1999). Проте цей метод має обмеження, а отже – й грубий рівень роздільності, оскільки існують різні таксономічні групи мікроорганізмів з однаковим діапазоном вмісту суми G+C. Перевагами гуанін-цитозинового аналізу є те, що цей

метод не залежить від ПЛР-аналізу, включає в себе аналіз всієї виділеної ДНК, а не її фрагментів, і є конкретним кількісним показником. За допомогою цього методу можна виявляти у мікробних угрупованнях рідкісні мікроорганізми. Одним із недоліків методу є потреба у відносно великій кількості ДНК для проведення G+C-аналізу (Tiedje et al., 1999).

**2. Реасоціація нуклеїнових кислот і гібридизація.** Реасоціація ДНК – це аналіз визначення генетичного складу мікробного угруповання, що застосовують для оцінки біорізноманіття мікроорганізмів у компонентах екосистем (Torsvik et al., 1996). Тотальну ДНК виділяють із природних зразків, наприклад з ґрунту, потім очищають, денатурують і регібридизують. Швидкість гібридизації або реасоціації залежить від подібності існуючих у ДНК послідовностей. Оскільки складність і різноманітність послідовностей ДНК збільшується, швидкість, з якою ДНК повторно асоціює, буде зменшуватися (Theron et al., 2000). За певних умов час, необхідний для реасоціації половини ДНК, може бути використаний як індекс різноманіття, адже він враховує кількість і розподіл реасоціації ДНК (Torsvik et al., 1998). З іншого боку, подібність між угрупованнями двох різних зразків можна визначати вимірюванням ступеня подібності ДНК шляхом кінетики гібридизації (Griffiths et al., 1999).

Гібридизація нуклеїнових кислот з використанням специфічних зондів є важливим якісним і кількісним аналізом у молекулярних методах екології бактерій (Theron et al., 2000; Eickhorst et al., 2008; Hirsch, 2010). Такі методи гібридизації проводять з використанням виділеної ДНК або РНК, або безпосередньо *in situ*. Олігонуклеотидні або полінуклеотидні зонди, розроблені з відомих послідовностей у діапазоні специфічності від домену до виду, можуть бути позначені маркерами на 5'-кінці. Флуоресцентні маркери, які зазвичай використовують для позначення зондів, включають в себе похідні флуоресцеїну або родаміну. Кількісну дот-блот гібридизацію використовують для визначення відносної

чисельності певної групи мікроорганізмів. Зразок лізують для вивільнення всіх нуклеїнових кислот. Виявлені послідовності рРНК, що становлять інтерес у дослідженні, кількісно аналізують загальну рРНК методом дот-блот гібридизації із специфічними та універсальними олігонуклеотидними праймерами. Відносний вміст рРНК може показувати зміни кількості популяції або зміни їх активності і відповідно кількісний вміст рРНК (Theron et al., 2000). Гібридизацію можна також проводити на клітинному рівні або *in situ*, що дає змогу отримувати інформацію щодо популяції мікроорганізмів у зразках навколишнього природного середовища. Раніше традиційно використовувались радіоактивні ізотопи для позначення олігонуклеотидних зондів, але останніми роками, надається перевага флуоресцентним зондам. Зразки фіксують для того, щоб підвищити проникну здатність клітин і до того ж зберегти клітинну структуру і цілісність. Зразок може бути або прикріплений до предметного скла, або гібридизуватись у суспензії. Флуоресцентно позначені праймери додаються до зразка, відбувається гібридизація, надлишки вимиваються, а вже потім визначають гібридизовані клітини (Head et al., 1998). Метод, відомий як флуоресцентна *in situ* гібридизація FISH (fluorescent *in situ* hybridization), був успішно використаний для вивчення просторового розподілу бактерій у біоплівках (Schramm et al., 1996) та для вивчення популяцій ґрунтових мікроорганізмів (Eickhorst et al., 2008; Hirsch, 2010).

Одним із недоліків *in situ* гібридизації, або гібридизації нуклеїнових кислот, виділених безпосередньо із об'єктів навколишнього природного середовища, є дуже низька його чутливість. Якщо послідовності із домінуючих видів не будуть становити велику кількість копій, їх, ймовірно, не буде виявлено. ПЛР-аналіз усуває таку проблему. Виділену ДНК безпосередньо з об'єктів навколишнього природного середовища можна використовувати як матрицю для ПЛР або мРНК, можна зворотню транскрибувати у кДНК, а потім ампліфікувати методом ПЛР (Van Elsas

et al., 1995). Використання мРНК у дослідженнях мікробного різноманіття дає змогу отримати інформацію щодо активності мікробної популяції, тоді як ДНК, виділена безпосередньо із об'єктів навколишнього природного середовища, може належати як активним, так і неактивним або взагалі неживим мікроорганізмам. Ампліфікований ПЛР-продукт можна гібридизувати із олігонуклеотидними зондами, що надасть конкретну інформацію про угруповання, або з іншими природними зразками, з якими схожість мікробного угруповання порівнюється.

**3. ДНК-мікрочіпи (DNA microarrays).** Останнім часом гібридизація ДНК-ДНК була використана разом з ДНК-мікрочіпами для виявлення та ідентифікації видів бактерій (Cho et al., 2001) або для оцінки мікробного різноманіття (Greene et al., 2003). Ці заходи можуть бути корисними у бактеріальних дослідженнях різноманіття, оскільки один мікрочіп може містити тисячі послідовностей ДНК (Cho et al., 2001) з високою специфічністю. Мікрочіпи можуть або містити конкретні гени-мішені, такі як нітрат-редуктази, нітрогенази або нафталіндіоксигенази, забезпечуючи функціональною інформацією про мікробне різноманіття, або містити природний зразок «стандартів» (фрагменти ДНК з менш ніж 70% гібридизацією), що репрезентує різні види, знайдені в природних зразках (Greene et al., 2003).

Метод зворотного зондування геному RSGP (reverse sample genome probing) застосовують для аналізу мікробного складу угруповань з найбільш домінуючими культивованими видами з використанням геномних мікрочіпів. Цей метод включає чотири етапи: 1) виділення геномної ДНК з чистих культур, 2) тестування на можливість перехресної гібридизації для отримання фрагментів ДНК з менш ніж 70% перехресною гібридизацією; ДНК-фрагменти з більш ніж 70% перехресною гібридизацією належать до того самого виду, 3) одержання геному мікрочіпів на твердій підставці і 4) випадкові маркування певної суміші загальної ДНК-мікроб-

них угруповань і внутрішнього стандарту (Greene et al., 2003). Цей метод був використаний для аналізу мікробних спільнот у нафтових родовищах (Voordouw et al., 1993) і в забруднених ґрунтах (Hubert et al., 1999; Greene et al., 2000). RSGP може бути корисний для вивчення мікробних угруповань тільки у тому разі, якщо мікробне різноманіття є нечисельним, оскільки деякі науковці зіткнулися з труднощами під час оцінки складу мікробних угруповань різних місць існування (Greene et al., 2003). Якщо мікробне різноманіття є чисельним, то перехресна гібридизація може бути проблемою або отримані результати буде важко інтерпретувати, наприклад як це було у дослідженнях довгострокових наслідків впливу добрив на угруповання діазотрофних мікроорганізмів (Bagwell et al., 2000).

Методи ДНК-ДНК-гібридизації, RSGP і мікрочіпів мають велику перевагу над методом ПЛР. Мікрочіпи можуть містити тисячі послідовностей гену-мішені. Однак це тільки дає можливість виявляти найбільш поширені види мікроорганізмів. Загалом такі види мікроорганізмів повинні мати здатність культивуватись на поживних середовищах, але й клоновані фрагменти ДНК некультивованих форм мікроорганізмів можна також використовувати. Мікробне різноманіття повинно бути мінімальним або здатним культивуватись, адже перехресна гібридизація може стати перешкодою для досліджень. Використання генів чи фрагментів ДНК замість геномів на мікрочіпах має певні переваги, наприклад, виключає необхідність постійно вирощувати культури мікроорганізмів, оскільки гени можуть бути клоновані у плазміді або ампліфіковані із використанням ПЛР. Крім того, фрагменти ДНК підвищують специфічність гібридизації порівняно з використанням геномів, а отже, функціональні гени у мікробних угрупованнях можуть бути визначені (Greene et al., 2003).

**4. Молекулярні методи з використанням ПЛР.** ПЛР з праймерами на 16S рРНК широко використовують для визначення різноманіття прокаріот, а також для їх іден-

тифікації та встановлення філогенетичного зв'язку (Pace, 1999). ПЛР на 18S рРНК і внутрішній транскрибований спейсер ITS дедалі частіше використовується для вивчення грибних угруповань. Проте наявна база даних не настільки повна, як для прокаріот (Prosser, 2002). Спочатку молекулярно-біологічні методи для екологічних досліджень були засновані на клонуванні генів-мішеней, виділених із зразків навколишнього природного середовища (Muyzer et al., 1999). Хоча секвенування стало загальноприйнятим на практиці, але для тисячі клонів залишається громіздким (Tiedje et al., 1999). Тому багато інших методів були розроблені для оцінки різноманіття мікробних угруповань. У цих методах тотальну ДНК виділяють відразу із зразків навколишнього природного середовища і очищають. ДНК-мішені (16S, 18S або ITS) ампліфікують з використанням універсальних або специфічних праймерів, і отримані продукти розділяють різними методами.

Денатуруючий градієнт гель-електрофорез DGGE і температурний градієнт гель-електрофорез TGGE – два аналогічні методи для вивчення мікробних угруповань. Спочатку ці методи були розроблені для виявлення точкових мутацій у послідовності ДНК. Але у 1993 р. (Muyzer et al., 1993) використання методу DGGE було розширено для вивчення мікробного генетичного різноманіття. ДНК екстрагують із зразків ґрунту і ампліфікують з використанням ПЛР та універсальних праймерів на послідовності рибосомальних генів 16S або 18S рРНК. На 5'-кінці праймер містить GC-кламп розміром 35–40 пар нуклеотидів, для того щоб принаймні частина ДНК залишилася дволанцюговою. Це необхідно, тому що під час поділу у градієнті поліакриламідного гелю з градієнтом зростає і концентрація денатуруючих речовин (формаміду і сечовини) на основі реакції плавлення дволанцюгової ДНК. Якщо GC-кламп відсутній, то ДНК-денатурація буде проходити в одному ланцюзі. За денатурації ДНК плавиться в областях із специфічною послідовністю і мігрує диференційно у поліакриламідному гелі (Muyzer, 1999).

Теоретично методом DGGE можна розділити ДНК з відмінностями в 1 парі нуклеотидів (Miller et al., 1999). Метод TGGE оснований на тому самому принципі, що і DGGE-метод, але замість хімічної денатурації розділення проводять у градієнті температури.

Перевагами методів DGGE/TGGE є їх надійність, здатність повторно відтворюватись, швидкість проведення і доволі доступна вартість. Можна проводити аналіз декількох зразків одночасно, що дає змогу стежити за змінами в мікробних популяціях (Muyzer, 1999).

Недоліками методів DGGE/TGGE є можливість деяких відхилень в проведенні ПЛР (Wintzingerode et al., 1997), труднощі підготовка зразків, що може потенційно впливати на зміни у мікробних угрупованнях, і різна ефективність виходу ДНК при її виділенні (Theron et al., 2000). Вважають, що DGGE-аналізом можна визначити тільки 1–2% мікробної популяції, які є представниками домінуючих видів мікроорганізмів, і існують у природних зразках (MacNaughton et al., 1999). Крім того, фрагменти ДНК із різними послідовностями можуть мати подібний характер рухливості у поліакриламідному гелі. До того ж одна смуга у гелі не обов'язково може відображати один вид бактерій (Gelsomino et al., 1999) і у зразках з одним видом бактерій, можуть з'являтися декілька бендів через чисельність генів 16S рРНК з незначними відмінностями у послідовностях ДНК (Maarit-Niemi et al., 2001).

У 2001 р. вченими було продемонстровано, що різні методи виділення ДНК та різні процедури їх очищення впливають на кількість бендів в DGGE-гелі (Maarit-Niemi et al., 2001). Під час виділення ДНК із зразків ґрунту за допомогою КІТА (МО-лабораторії Bio Інк, Солана-Біч, Каліфорнія, США) на DGGE-гелі були отримані послідовні, ясні бенди, до того ж найбільша їх кількість. За виділення ДНК прямими і непрямыми методами (Gelsomino et al., 1999) отримані ДНК-фінгерпринти були на 90% ідентичні для кожного зразка, а відмінності між кожним методом становили

менше 5%. Більшість відмінностей спостерігались між методами виділення ДНК та повторним відтворенням на DGGE-гелі слабких бендів, ймовірно, представників менш домінуючих видів (Gelsomino et al., 1999). Застосування DGGE у поєднанні з фракціонуванням G+C для оцінки біорізноманіття мікробних угруповань дає змогу виявляти види з низькою чисельністю.

Для визначення різноманіття були проаналізовані отримані методами DGGE/TGGE фінгерпринти, що оснований на кількості та інтенсивності ДНК-бендів на гелі, а також є подібними між процедурами. Проте, зважаючи на обмеження ПЛР та розподіл фрагментів, необхідно дотримуватись точності й бути обережними при інтерпретації результатів щодо мікробного різноманіття. Специфічні DGGE/TGGE-фрагменти також можуть бути вирізані з гелю, реампліфіковані та секвеновані або перенесені на мембрани і гібридизовані із специфічними праймерами для отримання більш структурних та функціональних результатів для оцінки різноманіття (Theron et al., 2000). У спосіб секвенування фрагментів можна визначити конкретні мікроорганізми в угрупованні. Замість звичайного спостереження за змінами у структурі мікробних угруповань на основі отриманих фінгерпринтів, можна отримати інформацію про конкретні таксономічні групи мікробних угруповань. Відомо, що рРНК-гени є головними об'єктами для досліджень мікробного різноманіття методом DGGE, але деякі дослідники проводять такі дослідження на цільових катаболічних генах, таких як гени метанмонооксигенази (Knief et al., 2003) для DGGE-аналізу. Це дає можливість отримати інформацію про різноманіття конкретних груп мікроорганізмів за певними функціями, таких як деградація забруднювачів.

Іншим методом, оснований на електрофоретичному розподілу послідовностей ДНК, є метод SSCP (*single strand conformation polymorphism*). Як і методи DGGE/TGGE, ця методика була спочатку розроблена для визначення відомого або нового поліморфізму, або точкових мутацій в ДНК

(Orita et al., 1989). Фрагменти одноланцюгової ДНК розділяють в поліакриламідному гелі на основі відмінностей в рухливості, зумовлених складом вторинної їх структури (Lee et al., 1996). Якщо фрагменти ДНК мають однаковий розмір і відсутній денатуруючий агент, складність, а отже і рухливість, залежить від послідовності ДНК. Метод SSCP має ті самі недоліки, що і DGGE. Крім того, деякі одноланцюгові ДНК можуть утворювати більше однієї стійкої схожості. Таким чином, одна послідовність може бути представлена більше ніж одним бендом у гелі (Tiedje et al., 1999). Але це не потребує використання GC-клампу або створення градієнт гелю, що можна застосовувати для вивчення біорізноманіття бактеріальних або грибових угруповань (Stach et al., 2001; Koberl et al., 2011). SSCP-аналіз також використовують для вимірювання послідовностей бактеріальних угруповань (Peters et al., 2000), складу ризосферної мікрофлори (Schmalenberger et al., 2001).

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) серед аналізів, оснований на поліморфізмі ДНК, які використовують для вивчення мікробного різноманіття, ПЛР-фрагменти 16S рРНК обробляють ферментами рестрикції, (Liu et al., 1997), які розщепляють ДНК у сайтах рестрикції довжиною 4 пари нуклеотидів. Фрагменти різної довжини розділяють в агарозному або неденатуруючому поліакриламідному гелі для аналізу мікробних угруповань (Tiedje et al., 1999). RFLP-аналіз може бути використаний для скринінгу клонів (Pace, 1996) або для вимірювання структури бактеріального угруповання (Massol-Deya et al., 1995). Цей метод зручний для виявлення структурних змін у мікробних угрупованнях, але не для вимірювання різноманіття чи виявлення конкретних філогенетичних груп (Liu et al., 1997). Смугастість у різних угрупованнях може бути занадто складною для аналізу методом RFLP, якщо один вид може мати від 4 до 6 рестрикційних фрагментів (Tiedje et al., 1999). Можливо, з використанням

ферментів рестрикції, які впізнають певну ділянку ДНК від 6 пар нуклеотидів, можна буде зменшити кількість рестрикційних фрагментів кожного виду і тим самим підвищити точність цього методу.

Поліморфізм довжини термінально мічених рестрикційних фрагментів T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) є більш удосконаленим і без недоліків, які має метод RFLP (Tiedje et al., 1999). Принцип методу T-RFLP такий самий, як і у методу RFLP, але в проведенні ПЛР використовують флуоресцентно-мічені праймери, наприклад, TET (4,7,2',7'-тетрахлоро-6-карбоксіфлуоресцеїн) або 6-FAM (фосфорамідит флуорохром 5-карбоксіфлуоресцеїн). Це дає змогу виявляти тільки термінально-позначені рестрикційні фрагменти (Liu et al., 1997). Своєю чергою, це зменшує кількість бендів у зразках і спрощує картину діапазонів, що уможливає проводити аналіз складних угруповань, а також надавати інформацію про мікробне різноманіття, оскільки кожний видимий бенд є єдиною оперативною таксономічною одиницею (Tiedje et al., 1999). Залежність від кількості бендів може бути застосована для визначення видового різноманіття, а також для порівняння зразків (Liu et al., 1997). Цей процес автоматизований, що дає змогу одночасно проводити аналіз великої кількості зразків ґрунту (Osborn et al., 2000). Також було перевірено здатність цього методу відтворювати отримані результати і виявлено, що отримана кількість бендів між зразками має високу відтворюваність (Osborn et al., 2000). Показано, що використання різних Taq-полімераз підвищує мінливість одного і того ж зразка ДНК. Метод T-RFLP обмежується не тільки екстракцією ДНК і ПЛР, а також підбором універсальних праймерів. Жодні з наявних праймерів, що використовуються для такого аналізу, не можуть ампліфікувати всі послідовності з еукаріот, бактеріальних і архейних доменів. Крім того, ці праймери основані на існуючій 16S рРНК, 18S рРНК та ITS-базі даних, яка здебільшого містить послідовності з культивованих форм мікроорганізмів і тому не

може репрезентувати справжнє мікробне різноманіття у зразках (Liu et al., 1997). Крім того, під час рестрикції ПЛР-продукту різними ферментами може бути отримане неоднакове різноманіття фінгерпринтів (Dunbar et al., 2000). Тому важливим є використання від 2 до 4 різних ферментів рестрикції (Tiedje et al., 1999). Метод T-RFLP, як і будь-який метод, оснований на ПЛР, може недооцінити справжнє мікробне різноманіття, оскільки тільки чисельно домінуючі види виявляються через велику кількість ДНК. Крім того, різні види мікроорганізмів будуть мати різну кількість копій гена, що може призводити до створення результатів (Liu et al., 1997). Неповне розщеплення ПЛР-продукту ферментами рестрикції також може призводити до повторного проведення оцінки різноманіття (Osborn et al., 2000). Незважаючи на ці недоліки, одні дослідники вважають, що у разі хоча б разової стандартизації T-RFLP може бути корисним методом для вивчення мікробного різноманіття у навколишньому природному середовищі (Liu et al., 1997; Tiedje et al., 1999; Osborn et al., 2000), а інші – що цього недостатньо. Під час статистичної обробки отриманих результатів було помічено невідповідність у отриманих ДНК-фрагментах залежно від застосованого ферменту. А зразки з чотирьох різних типів ґрунтів значно не відрізнялися один від одного. T-RFLP також вважається відмінним методом для порівняння різних зразків (Dunbar et al., 2000).

Метод T-RFLP використовують для вимірювання просторових і часових змін у бактеріальних угрупованнях (Lukow et al., 2000; Navarrete et al., 2010; Chau et al., 2011; Wang et al., 2012), для вивчення складних бактеріальних угруповань (Moeseneder et al., 1999; Wang et al., 2012), для виявлення та моніторингу популяцій (Tiedje et al., 1999) та оцінки різноманіття ендомікоризних грибів у ризосфері *Viola calaminaria* у ґрунті, забрудненому важкими металами (Tonin et al., 2001). Під час виявлення та відстеження конкретних риботипів у п'ять разів було ефективнішим застосування методу T-RFLP, ніж методу DGGE (Tiedje et al. 1999).

*Рибосомальний міжгенний аналіз RISA (ribosomal intergenic spacer analysis) та автоматизований рибосомальний міжгенний аналіз ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis)* мають багато подібного з принципами методів RFLP і T-RFLP, що забезпечує рибосомальний фінгерпринтинг мікробних угруповань. У методах RISA і ARISA регіон міжгенного спейсеру між 16S і 23S субодиницями рибосом ампліфікують та посилюють методом ПЛР, денатурують і розділяють у поліакриламідному гелі за денатуруючими умовами. Цей регіон може кодувати тРНК і бути корисним для визначення відмінностей між бактеріальними штамми та близькоспорідненими видами через неоднорідність довжин та послідовностей у регіонах міжгенних спейсерів (Fisher et al., 1999). У RISA послідовність поліморфізмів визначають з використанням фарбування сріблом, тоді як у методі ARISA використовують флуоресцентно позначений праймер для ПЛР, а фрагменти визначаються автоматично (Fisher et al., 1999). Обидва методи забезпечують високу відтворюваність профілів бактеріальних угруповань, але метод RISA потребує великої кількості ДНК, займає більше часу, а фарбування сріблом є доволі нечутливим, і резолюційна здатність має тенденцію до зниження (Fisher et al., 1999). ARISA підвищує чутливість методу і зменшує час його проведення, але характеризується традиційними обмеженнями при ПЛР (Banning et al., 2011). Метод RISA використовували для порівняння мікробного різноманіття у ґрунті, у ризосфері рослин (Wongman et al., 1997), у забрудненому ґрунті (Ranjard et al., 2000) і як відповідь на інокуляцію (Yu et al., 2001).

*Характеристика високоповторюваної послідовності, або мікросателітної послідовності (Highly repeated sequence characterization or microsatellite regions)*. Багато як еукаріотичних, так і прокаріотичних організмів містять часто повторювані короткі послідовності ДНК від 1 до 10 пар нуклеотидів, які повторюються у всьому геномі (Tiedje et al., 1999). Залежно від швидкості еволюції, ці послідовності мо-

жуть бути діагностовані та розподілені за видом або штамом (Zeze et al., 1996). Цей метод використовували для ідентифікації бактерій, оскільки він забезпечує геномний фінгерпринтинг структури хромосоми, а структура хромосом, вважається, відрізняється навіть штамми (Tiedje et al., 1999). Високоповторювані послідовності також називають мікросателітними повторами, які було використано для ідентифікації мікоризи (Longato et al., 1997). Фінгерпринтинг мікросателітних ампліконів може порівнюватись з використанням індексів подібності визначення різниці на між- і внутрішньовидовому рівнях (Longato et al., 1997). Використання цього методу для вивчення мікробного різноманіття може мати певні обмеження залежно від складності угруповання, також бути корисним для розробки зондів для виявлення змін у мікробних угрупованнях, спричинених зміною навколишнього природного середовища. Серед обмежень цього методу є і те, що мікросателітна послідовність має бути відомою, лише тоді відповідні праймери можуть бути використані.

Вивчення мікробного різноманіття є важливим не тільки для фундаментальних наукових досліджень, а й для розуміння зв'язку між різноманіттям мікроорганізмів, структурою їх угруповань і функціями, які вони виконують у навколишньому природному середовищі. Антропогенні та техногенні чинники переважно негативно впливають на різноманіття біоценозів екосистем і, зокрема, на мікробне. Наприклад, виявлено значно більші кількості 16S рРНК для всіх проаналізованих груп мікроорганізмів у ґрунтах, на яких ніколи не вирощували сільськогосподарські культури, порівняно із ґрунтами сільськогосподарських угідь (Buckley et al., 2001). Це свідчить про зниження бактеріальної біомаси та її активності в ґрунті орних земель. Також було показано динаміку зменшення різноманіття ендемікоризних грибів

у ґрунті орних угідь порівняно з ґрунтом природних екосистем (Daniell et al., 2001; Menendez et al., 2001). Проте точно не відомо, що означає таке зменшення мікробного різноманіття для функціонування екосистем у цілому, і тому є важливими дослідження, які дадуть розуміння зв'язку між змінами різноманіття мікроорганізмів та змінами їх функціональної активності. Знання про цей зв'язок обмежені через таксономічні та методологічні недоліки, пов'язані з вивченням цих мікроорганізмів. Хоча кількісні, таксономічні, структурні методи для вивчення мікробного різноманіття з часом удосконалюються як для бактерій, так і для грибів, але й досі не встановлено чіткої взаємозалежності між різноманіттям мікроорганізмів і функціями, що вони виконують в ґрунті.

## ВИСНОВОК

Таким чином, можливості вивчення і розуміння різноманіття ґрунтових мікроорганізмів мають певні таксономічні і методологічні обмеження. Мікробіологи стикаються з важкими завданнями визначення та ідентифікації ґрунтових мікроорганізмів і вивчення їх функцій у ґрунтовому середовищі. І хоча молекулярні методи мають переваги в отриманні інформації про некультивовані форми мікроорганізмів, їм також характерні певні обмеження, які не можуть бути проігноровані. Оскільки досі немає точного уявлення, про видове різноманіття мікроорганізмів, тому не можна вибрати метод для його визначення, який був би найкращим. Кожен метод має свої обмеження і переваги та дає лише уявлення про один із аспектів мікробного різноманіття ґрунту.

На сьогодні немає більш інформативного способу вивчення різноманіття ґрунтових мікроорганізмів, як використання комплексу молекулярних методів, за допомогою яких можна отримати найповніші знання про стан та життєдіяльність мікробного угруповання.