

№18 2001 год МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Значение проблемы исследования структуры природных микробных сообществ

Исследование реакции живых организмов на изменения окружающей среды чрезвычайно важно для оценки влияния этих изменений, особенно имеющих антропогенное происхождение, на биоразнообразие, сохранение которого является важнейшей задачей человеческой цивилизации. Среди естественных компонентов биосферы значительное место занимают микроорганизмы. В силу высокой скорости эволюции микроорганизмы наиболее эффективно реагируют на изменение окружающей среды, так что исследование природных микробных сообществ позволяет наиболее оперативно оценить эффекты изменений окружающей среды на биоразнообразии. Такие исследования приобретают в последние годы важное значение в связи с широким распространением генетически модифицированных микроорганизмов и практически бесконтрольным, а все чаще и направленным попаданием их в естественные микробные сообщества. Все эти воздействия могут создать проблемы, связанные с распространением чужеродных генетических конструкций в природных сообществах, так называемым горизонтальным переносом генов, что неминуемо приведет к существенному ускорению эволюции микробных сообществ, появлению новых форм с новыми генетическими признаками. Оценка устойчивости таких форм и содержащихся в них конструкций, а также последствий их появления в природе чрезвычайно важна для разработки стратегий последующего развития общества.

Таким образом, исследования в этом направлении призваны ответить на следующие основные вопросы.

1. Какова структура микробного сообщества в исследуемом микроареале (участок суши, пресноводный бассейн или участок морской или океанической акватории и т.п.).
2. Меняется ли структура микробного сообщества в исследуемом микроареале под воздействием тех или иных причин и каким образом.
3. Меняются ли взаимоотношения между участниками микробного сообщества в процессе изменения структуры сообщества, в чем состоят эти изменения.
4. Как происходит обмен генетическим материалом между участниками экосистемы, имеет ли место так называемый горизонтальный перенос генетической информации.

Ответ на последний вопрос особенно важен в связи с широким распространением в природных сообществах генетически модифицированных микроорганизмов.

Попытки найти ответ на первый вопрос сталкиваются со значительной проблемой, важность которой исследователи начали осознавать лишь сравнительно недавно. Понятие структуры микробного сообщества, по сути дела, подразумевает установление видового разнообразия сообщества. Однако определение вида микроорганизма представляет собой серьезную проблему, поскольку само понятие вида в мире микробов не столь четко определено, как в биологии высших организмов, где основными критериями вида чаще всего являются внешние признаки. До последнего времени по той же схеме строилась и систематика микроорганизмов, однако наряду с морфологическими признаками используют и биохимические признаки. Последнее уже существенно отличает систематику микроорганизмов от таковой для высших микроорганизмов, однако, по современным представлениям, все же оказывается недостаточным. Неясно, в частности, где кончаются штаммовые различия и начинаются видовые.

Другая важная проблема исследования разнообразия природных микробных сообществ состоит в том, что подавляющее большинство находящихся (и активно развивающихся) в природных условиях микроорганизмов не удается перевести в культуру, что исключает использование фенотипических признаков в систематике этих «некультивируемых» микроорганизмов.

В связи с этими обстоятельствами в последние годы систематика и филогения микроорганизмов строятся все чаще на различиях в структуре генома и переходят в область геносистематики, основанной на новейших достижениях молекулярной биологии.

Молекулярно-биологические подходы к исследованию структуры микробных сообществ

Сущность этих подходов основана на анализе разнообразия консервативных элементов генома микроорганизмов. Наиболее распространенным является анализ, основанный на вариабельных фрагментах консервативных элементов генов рРНК. Выбор именно этих генов обусловлен, прежде всего, их повсеместной распространенностью во всем живом мире и доступностью огромных массивов данных о структуре генов рРНК у самых разнообразных микроорганизмов. Именно при сравнении структуры генов рРНК были предложены основы современной систематики живых организмов, предусматривающей разделение всего живого на три домена: Bacteria, Archaea и Eukarya [1]. Исследование тонких различий в последовательности гена рРНК позволяет вычлнить более мелкие систематические единицы и в конце концов построить детальную систематику живых организмов. Следует, однако, иметь в виду, что, ограничиваясь изучением разнообразия лишь одного генетического локуса, даже весьма информативного, мы рискуем получить не вполне адекватные результаты [2]. В принципе такая методология применима к любому гену. В качестве примера могут быть приведены результаты по изучению бактерий, деградирующих ароматические

углеводороды [3, 4], и микроорганизмов, устойчивых к ртути [5]. Очевидно, что при исследовании распространения в природных микробных сообществах генов, встроенных в генетически модифицированные микроорганизмы соответствующими маркерами должны служить сами эти гены или их фрагменты. В этом случае структура маркерной последовательности не является предметом тщательного выбора, поскольку последовательность встроенного гена, как правило, хорошо известна.

Схема проведения исследований

Первым этапом работы является, естественно, получение материала для исследований. Речь идет в нашем случае о нуклеиновом материале из образцов почвы, воды или придонного осадка. Поскольку извлеченного материала, как правило, недостаточно для непосредственной идентификации, следующим этапом исследования всегда является амплификация фрагментов полученного генетического материала с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующим образом подобранными праймерами. Целью амплификации является наработка материала в количестве, достаточном для последующих экспериментов по идентификации штаммов микроорганизмов, источников этого материала. Продукты амплификации далее используются для анализа либо путем прямого секвенирования, либо с помощью электрофореза в градиенте денатурирующего агента (DGGE), или для гибридизации *in situ* (FISH).

Получение и исследование образцов нуклеинового материала

Естественно, что для такого рода исследований необходимы не столько клетки микроорганизмов, сколько их генетический материал, в связи с чем разработаны подходы, основанные на извлечении из образцов окружающей среды именно нуклеиновых кислот, изучение которых и становится основным методом исследования структуры микробных сообществ. Процедура извлечения нуклеиновых кислот из образцов окружающей среды достаточно трудоемка, и на ней мы особо остановимся ниже.

Проблема здесь заключается в том, что большая часть микроорганизмов из природных образцов при попытках пересева на синтетические питательные среды переходит в так называемое «некультивируемое» состояние. Это обстоятельство приводит к тому, что при извлечении микроорганизмов из образцов окружающей среды мы никогда не можем быть уверены в представительности получаемой выборки. Критерии такой представительности не ясны, так что мы на самом деле никогда не знаем, насколько полна картина структуры сообщества, которую нам удается выявить в последующих экспериментах.

В обзоре ван Эльзаса с соавторами [6] подробно проанализирована экстракция нуклеиновых кислот из образцов почвы. Были предложены два изначально различных подхода: прямой лизис *in situ* и извлечение клеток с последующим лизисом.

Прямая экстракция ДНК из почв, как показали исследования авторов, применима к различным почвам и дает выход ДНК чаще всего в диапазоне от 10 до 30 мкг/на г почвы. Следует, однако, иметь в виду, что выход колеблется в зависимости от состава почвы, так что необходимо подбирать условия эксперимента для данной конкретной почвы. В отдельных случаях отмечен на порядок меньший выход ДНК, хотя в этих случаях отмечено и более низкое содержание колониеобразующих единиц микрофлоры.

Непрямая экстракция ДНК с предварительным извлечением клеток весьма существенно зависит от способа экстракции микробных клеток из почвы.

Этой же группой исследователей [7] подробно описана процедура экстракции рРНК и геномной ДНК из образцов почвы. Сущность процедуры сводится к отделению клеток от частиц почвы с последующим разрушением клеток путем обработки шариками, детергентом, экстракцией фенолом, фенол-хлороформ-ной смесью и далее — стандартными приемами очистки нуклеиновых кислот и разделения на фракции РНК и ДНК. Выход ДНК и рРНК составлял 15-30 и 0,25-1,0 мкг/г почвы соответственно.

В случае водных микроорганизмов проблема выделения нуклеиновых кислот решается проще: клетки выделяют фильтрованием и затем лизируют либо непосредственно на фильтре и проводят ПЦР также на фильтре, либо подвергают клетки ферментативному лизису с последующей экстракцией ДНК фенолом и хлороформом [см. обзор 8].

Анализ генетического материала

После того как образец нуклеинового материала тем или иным способом получен, дальнейшие действия исследователя обычно сводятся к одному из стандартных планов. Нуклеиновый материал подвергают амплификации со специально подобранными (сконструированными) праймерами. Выбор праймеров также требует тщательного продумывания. Очень важно осуществить оптимальное выравнивание последовательностей генов рРНК, если именно эти гены решено далее использовать в анализе природного материала. Используются, в частности, «универсальные» праймеры, сконструированные для амплификации генов рРНК из определенной группы микроорганизмов [2]. Продукт амплификации затем подвергается клонированию одним из стандартных приемов. Полученные клоны чаще всего подвергают секвенированию, хотя используются и методы гибридизации с соответствующими зондами непосредственно на колониях клеток, в которых проводилось клонирование. Для обнаружения определенных микроорганизмов в исследуемых образцах (равно как и при исследовании распространения генетически модифицированных микроорганизмов, несущих определенные генетические встройки, в образцах из окружающей среды) используются специфические праймеры. В частности, такие исследования проводятся для выявления определенных микроорганизмов в клинических образцах [9], пищевых продуктах [10]. Подходы, основанные на применении специфических праймеров, часто оказываются высокоспецифичными и чувствительными, особенно при использовании различных модификаций, усиливающих параметры теста. Недостатком их в то же время является трудность создания системы количественной оценки содержания соответствующих микроорганизмов в исследуемом образце.

Весьма широко распространенным методом анализа продуктов амплификации на предмет выявления структуры микробного сообщества является гель-электрофорез в градиенте концентрации денатурирующего агента. Метод позволяет разделять гетерогенную смесь продуктов ПЦР в полиакриламидном геле. При этом продукты разделяются не по размеру, а по степени

прочности вторичной структуры, что отражает степень гомологии последовательностей гена рРНК исследуемого и референтного штаммов, а следовательно, и степень филогенетического родства между этими штаммами.

Некоторые результаты

Применение упомянутых методов позволило решить ряд задач по установлению структуры микробных сообществ.

В группе Хада [11, 12] подробно исследована филогения некультивируемых гигантских серных бактерий рода *Achromatium*, известных с конца 19 века и до настоящего времени не переведенных в культуру. Исследования проведены методом гибридизации *in situ* с помощью олигонуклеотидных зондов, несущих флуоресцентную метку (метод FISH). Зонды направлены на консервативные участки гена 16S рРНК.

Тем же методом на основе гомологий фрагментов гена 16S рДНК систематизированы штаммы филаментных микроорганизмов типа Eikelboom 021N рода *Thiothrix*, из них 15 выделены из активного ила впервые. Построено филогенетическое дерево [13].

Значительные результаты получены при исследовании сообществ микроорганизмов, обитающих в водной среде и придонных отложениях. В группе Хубера [14] при исследовании холодных серных источников в Баварии идентифицированы новые археи, живущие в тесной ассоциации с бактериями. Микроорганизмы образуют характерные, видимые невооруженным глазом структуры, морфологически напоминающие нити жемчуга. Исследования методом FISH показали, что внешняя часть «жемчужин» состоит в основном из бактерий с преобладанием нитевидных бактерий. Внутри преобладают археи-кокки, до 10-7 клеток в «жемчужине». По данным анализа 16S рРНК, археи могут быть отнесены к подцарству эуриархеев. Обнаруженная новая, характерная для эуриархеев последовательность представляет глубокую филогенетическую ветвь дерева 16S рРНК и не проявляет существенной гомологии с каким-либо культивируемым археем или с последовательностью какого-либо гена 16S рРНК из окружающей природы. Построено филогенетическое дерево выделенных микроорганизмов археев и определено положение на этом дереве вновь выделенных штаммов. При исследовании морских микробных сообществ в северной области Красного моря в этой же лаборатории [15] обнаружены новые виды рода *Halanaerobium*, являющиеся первыми представителями рода, полученными из глубоководных анаэробных рассолов. Обнаруженные микроорганизмы хорошо растут в глубоководной рапе в анаэробных условиях и могут вносить существенный вклад в анаэробную деградацию органического вещества на межфазовой границе рапа/морская вода.

DeLong с соавторами [16] исследовали морские планктонные бактерии с использованием метода FISH. Для повышения чувствительности процедуры авторы предложили использовать в качестве зондов полирибонуклеотиды, меченные флуорохромом. В такой модификации метод позволяет уверенно проводить идентификацию и подсчет планктонных клеток на океанских глубинах до 3400 м. Прослежены доминирующие организмы по всей глубине столба воды. Окрашивать удается 90-100% клеток. Показано, что большинство планктонных археев содержат достаточное количество рибосом, что делает их весьма доступными для обнаружения с помощью полирибонуклеотидных зондов.

Аманн с соавторами в своих обзорах [17, 18] подробно проанализировали результаты собственных исследований и данных литературы по изучению филогенетических отношений микроорганизмов на основе метода гибридизации *in situ*. В цитируемых ими исследованиях, проведенных в том числе на микроорганизмах — симбионтах высших организмов, макроорганизм рассматривается как малая экосистема, населенная ограниченным числом видов. Последнее делает эту систему удобной для проверки и отладки различных подходов к установлению структуры микробных сообществ. Авторы отмечают, в частности, большую важность таксономически точного и количественного описания структуры микробных сообществ, причем в настоящее время именно подходы, основанные на анализе нуклеиновых кислот, дают наиболее точные ответы на оба этих вопроса. Применение этих подходов позволило в ряде случаев установить филогенетические отношения между микроорганизмами — симбионтами различных высших организмов. Исследование подобного рода симбиотических отношений в так называемых «хемоавтотрофных» беспозвоночных с помощью рРНК-анализа позволило уточнить состав микробной части этой системы. При этом микроорганизмы, составляющие микробное сообщество, в этой системе не культивируются. Аналогичные результаты получены для простейших, насекомых и высших позвоночных.

Значительные результаты получены в идентификации некультивируемых микроорганизмов, являющихся возбудителями инфекций.

Интересные результаты получены в систематике особой группы бактерий — магнетотактиков, участников сообществ морского пикопланктона, консорциумов, образующих биопленки.

Ограничения

При всех больших возможностях, которые предоставляют современные методы исследования микробных сообществ, основанные на достижениях молекулярной биологии, следует иметь в виду, что и эти методы имеют ряд ограничений, требующих дальнейшего совершенствования экспериментальной техники. Ниже мы упомянем некоторые проблемы, с которыми приходится сталкиваться и которые необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментов.

Экстракция НК

Проблема состоит в том, что, как мы уже упоминали, никогда нельзя сказать, насколько полно извлечены нуклеиновые кислоты из образца окружающей среды. Культивирование клеток не дает представления об этом, поскольку в культуру удается перевести по разным оценкам лишь от 1 до 20% микроорганизмов, находящихся в исследуемом образце. Широко используются методы так называемой «прямой экстракции» нуклеинового материала из образцов, при которых часто клетки подвергают (после некоторой отмычки от неклеточного материала) непосредственному разрушению комбинацией обычных процедур: замораживание-оттаивание, детергентный лизис, механическое (ударное) разрушение. При этом разрушаются и эндоспоры. Мелкие клетки более устойчивы к лизису. Считается, что такого рода обработки приводят к извлечению 96% нуклеинового материала, а

длительные многократные обработки позволяют извлекать 99,8% этого материала. Однако всегда остается открытым вопрос, насколько эти оценки близки к истине, поскольку содержание нуклеотидного материала в образце неизвестно [1].

DGGE

Метод особенно полезен при оценке временной динамики популяции. Если полоса приписана точно к определенному виду микроорганизма, изменения относительной интенсивности могут быть оценены количественно. В то же время однозначное отнесение полосы к определенному виду или группе микроорганизмов часто оказывается затруднительным. В этом случае количественные оценки малодостоверны [2].

ПЦР

Частота встречаемости определенных типов последовательностей иногда принимается за характеристику распространенности данного вида.

Однако доза гена рРНК в разных геномах существенно отличается: от 1 копии до 14. По этой причине соотношение продуктов амплификации может не отражать соотношение численности микроорганизмов в исследуемом сообществе. Важен также выбор праймеров. Существуют пары праймеров, дающие строгую корреляцию соотношения продуктов амплификации и количества копий генов в исследуемой популяции. Другие праймеры приводят к соотношению продуктов амплификации 1:1 независимо от соотношения копий генов в исходном образце.

При анализе структуры природных сообществ часто наблюдаются неразрешаемые очень близкородственные клоны. Эти клоны не всегда отражают реальную картину, а являются зачастую следствием накопления различных ошибок амплификации, клонирования, секвенирования. Кроме того, в процессе амплификации ДНК, содержащей фрагменты генома различных микроорганизмов, отмечается образование химерных продуктов, собранных из последовательностей различных видов [10, 17-19]. Причины образования таких продуктов могут быть различными, их выявление и исключение из рассмотрения достигается всякий раз своим путем, заключающимся, как правило, в последовательном применении ПЦР со специально сконструированными парами праймеров.

Некоторые ограничения накладывает и сам выбор генов рРНК в качестве референтного генетического материала [18]. 16S рРНК, возможно, слишком консервативна, чтобы дискриминировать популяции близкородственных видов. В подобных ситуациях, может быть, более полезной окажется 23S рРНК. Она примерно в 2 раза длиннее и содержит несколько высоковариабельных областей. Проблемой может оказаться также и обнаруживаемая в некоторых случаях гетерогенность среди оперонов рРНК в одном и том же организме. Еще одно ограничение происходит из-за того, что разнообразие рРНК описано лишь частично. В связи с этим зонд, созданный как специфичный для набора тест-организмов, может также гибридизоваться с какими-либо неизвестными организмами. С другой стороны, могут быть неизвестные организмы, являющиеся членами филогенетического семейства тестового набора микроорганизмов, но не содержащие сайта, выбранного в качестве мишени. Иными словами, никогда нельзя быть до конца уверенным в специфичности используемых зондов. Способом преодоления этой проблемы может быть использование нескольких разных зондов или маркерных генов. Особенно этот подход оказывается информативным при использовании FISH в качестве метода детекции.

Имеется также опасность не заметить малораспространенные микроорганизмы, доля геномных фрагментов которых мала по сравнению с наиболее широко представленными в исследуемом образце. В некоторых случаях эту проблему удается разрешить путем обогащения тем или иным способом этих малораспространенных геномов, иногда — путем непосредственного отбора клеток из фиксированного образца, что, безусловно, представляет собой исключительно трудоемкую процедуру. Возможно, еще одним подходом к решению такого рода задач может оказаться обеднение анализируемого образца распространенными последовательностями, например, аффинным извлечением наиболее широко представленных последовательностей с помощью набора пептидно-нуклеиновых «скрепок» (PNP-clamps) [20].

Перспективы

Для построения новой — геномной — систематики живых организмов необходимо совершенствование методической базы исследований, создание еще более высокопроизводительных приемов, которые могли бы позволить в относительно короткие сроки осуществлять массовый анализ последовательностей генетического материала на предмет их сходства и различия. В связи с этим представляется перспективным развитие техники эксперимента в направлении создания ДНК-микрочипов с универсальными зондами, а также устройств проточного типа для микрофлуориметрической детекции и количественной характеристики комплексов зондов с фрагментами исследуемого генетического материала.

Исследование детальной структуры сообществ микроорганизмов в окружающей среде может потребовать не только генетической характеристики сообществ по маркерным генам, но и дополнительной физиолого-биохимической характеристики обнаруженных штаммов, поскольку различия между штаммами могут заключаться не только в структуре определенного участка генома, но и в его функциях, точнее, в программе их реализации. В этом смысле, возможно, важную дополнительную информацию могут дать исследования динамической протеомики, которые к тому же позволят проследить судьбу генов в интродуцированных в природную популяцию генетически измененных микроорганизмах, а также в «аборигенных» микроорганизмах, соседствующих с интродуцируемым штаммом. Правда, для проведения таких исследований необходимо перевести клетки аборигенных микроорганизмов в культивируемое состояние.

Проблема ограниченной способности к культивированию также требует своего решения. Важно, в частности, дать ответ на вопрос, являются ли микроорганизмы, которые удается перевести в культуру, не «лабораторными сорняками», а действительно участниками реальных природных сообществ. При этом ценность попыток перевода в культуру доселе некультивируемых штаммов возрастает, поскольку это будет помогать выяснять причины невозможности культивирования микроорганизмов, которые широко распространены в природе, и, следовательно, способны размножаться.

Литература

1. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 4576-4579.
2. Head I.M., Saungers J.R., Pickup R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms // *Microb. Ecol.* 1998. V. 35, № 1. P. 1-21.
3. Silva M.C., Morel M.I., Batt C.A. Development of a molecular detection method for naphthalene degrading pseudo-monade // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1995. V. 18. P. 225-235.
4. Master E.R., Mohn W.W. Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures // *Appl. Env. Microbiol.* 1998. V. 64, № 12. P. 4823-4829.
5. Osborn A.M., Bruce K.D., Strike P., Ritchie D.A. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon // *FEMS Microbiol. Rev.* 1997. V. 19. P. 239-262.
6. van Elsland J.D., Duarte G.F., Rosado A.S., Smalla K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment // *J. Microbiol. Methods.* 1998. V. 32. P. 133-154.
7. Duarte G.F., Rosado A.S., Seldin L. et al. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community // *J. Microbiol. Methods.* 1998. V. 32. P. 21-29.
8. Atlas R.M., Slayer G., Burlage R.S., Bej A.K. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms // *BioTechniques.* 1992. V. 12, № 5. P. 706-717.
9. Drancourt M., Bollet C., Carlioz A. et al. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38, № 10. P. 3623-3630.
10. Giraffa G., Neviani E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems // *Intern. J. of Food Microbiol.* 2001. V. 67, № 1-2. P. 19-34.
11. Head I.M., Gray N.D., Clarke K.J. et al. The phylogenetic position and ultrastructure of the uncultured bacterium *Achromatium oxaliferum* // *Microbiology.* 1996. V. 142. P. 2341-2354.
12. Head I.M., Gray N.D., Babenzien H.-D., Glockner F.O. Uncultured giant sulfur bacteria of the genus *Achromatium* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. V. 33. P. 171-180.
13. Kanagawa T., Kamagata Y., Aruga S. et al. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge // *Appl. Env. Microbiol.* 2000. V. 66, № 11. P. 5043-5052.
14. Rudolph C., Wanner G., Huber R. Natural communities of novel Archaea and Bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology // *Appl. Env. Microbiol.* 2001. V. 67, № 5. P. 2336-2344.
15. Eder W., Jahnke L.L., Schmidt M., Huber R. Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrut deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods // *Appl. Env. Microbiol.* 2001. V. 67, № 7. P. 3077-3085.
16. DeLong E.F., Taylor L.T., Marsh T.L., Preston C.M. Visualization and enumeration of marine planktonic Archaea and Bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization // *Appl. Env. Microbiol.* 1999. V. 65, № 12. P. 5554-5563.
17. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59, № 1. P. 143-169.
18. Amann R., Ludwig W. Ribosomal RNA — targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. V. 24. P. 555-565.
19. Speksnijder A.G.C.L., Kowalchuk G.A., De Jong S. et al. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences // *Appl. Env. Microbiol.* 2001. V. 67, № 1. P. 469-472.
20. Chandler D.L., Stults J.R., Cebula S. et al. Affinity purification of DNA and RNA from environmental samples with peptide nucleic acid clamps // *Appl. Env. Microbiol.* 2000. V. 66, № 8. P. 3438-3445.

С.Н. Загребельный, д.б.н., Новосибирский государственный университет