Вестник ТвГУ. Серия "Биология и экология". 2019. № 3(55). С. 47-60.

БИОХИМИЯ

УДК 577.29

ПОДБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ МИКРОБНОЙ ДНК ИЗ СБРАЖИВАЕМОЙ МАССБ1 БИОГАЗОВБ1Х ПРОИЗВОДСТВ*

К.С. Бояршин^, Ю.Р. Ходжаев^, Е.Ф. Сорокина^, В.А. Яценко^, В.В. Клюева^, И.К. Мейлах^'^, В.П. Бредихин^'^, И.В. Батлуцкая^
'Белгородский государственный национальный исследовательский ниверситет, Белгород
^000«АльтЭнерго», Белгород
^АО«Белгородский институт Альтернативной энергетики», Белгород

Технология переработки органических отходов с получением биогаза и органических удобрений основана на их микробиологическом разложении и сбраживании. В её основе лежит спонтанное формирование сложного микробного сообщества, характеризующегося распределением экологических ниш и развитыми трофическими связями. Экологическая и таксономическая структура этого сообщества может служить важным показателем при оптимизации технологии и поддержании стабильности производственного процесса. Перспективным методом анализа таксономической структуры сложных микробных сообществ является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ), требующая получения очищенных препаратов суммарной микробной ДНК из образцов сложного химического состава. Данная работа посвящена подбору недорогого и эффективного метода получения таких препаратов из сбраживаемой массы биогазовых производств. Показана пригодность и эффективность метода, основанного на применении сорбирующих ДНК микрочастиц отечественного производства, предложены меры по его улучшению.

Ключевые слова: выделение ДНК, микробные сообщества, биогаз, ПЦР РВ, микрочастицы.

DOI: 10.26456/vtbio97

Введение. Эффективным способом зггилизации органических отходов животноводства, растениеводства и пищевой промышленности является их сбраживание с ползшением биогаза - многокомпонентной газовой смеси, обладающей горючими

* Исследование выполнено при поддержке гранта Департамента агропромышленного комплекса и воспроизводства окружающей среды Белгородской области.

свойствами за счёт высокого содержания метана. Разложение отходов и последзлощее сбраживание продзтстов разложения обеспечивается самостоятельно формирзтощимся сообществом микроорганизмов, включающим большое число видов различной таксономической принадлежности, способных к жизни в анаэробных условиях. Состав таких сообществ представляет немалый интерес с точки зрения биотехнологии переработки отходов (Traversi et al., 2012; Diaz et al., 2010).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ) (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993) нашла широкое применение в микробиологических исследованиях (Маскау et al., 2007) благодаря способности различения филогенетически обусловленных особенностей последовательностей ДНК различных микробных таксонов. Эта способность обеспечивается разработкой праймеров с таксонной и грзтшовой специфичностью, характериззтощихся соответствием зшикальным последовательностям в геномной ДНК, специфичным для определённой грзшпы или таксона микроорганизмов (Baker et al., 2003). Существзтот примеры успешного использования этого метода для анализа микрофлоры почв (Fierer et al., 2005; Бражникова и др., 2012), кишечной микрофлоры животных (Heinritz et al., 2016; Furet et al., 2009) и человека (Matsuki et al., 2004; Полуэктова и др. 2014), дрзтих сложных микробных сообществ. Внедрение молекулярно-биологических методов в практику их иззшения продемонстрировало, в частности, изобилие в средовых и биологических образцах видов микроорганизмов, для которых до сих пор не были подобраны условия, позволяющие их культивирование (Gassier et al., 2008; Smith, Osborn, 2009).

Подбор и отработка методов выделения сз^марной ДНК микробных сообществ для анализа молекулярно-биологическими методами нередко представляет собой непростзто задачу и становится темой развёрнзггых исследовательских работ (Stinson et al., 2018; Liu et al., 2018). В нашем слзшае мы поставили задачу подобрать метод не просто подходящий и эффективный, но также относительно дешёвый, благодаря отказу от импортных реактивов и материалов, закзшка и доставка которых обычно связана с сзтцественными затратами денег и времени. Достижение цели осложнялось характером проб, содержавших широчайший спектр органических соединений за счёт разнообразия отходов, используемых в промышленном биогазовом реакторе.

Подбор и оптимизация метода выделения ДНК из микробного сообщества биогазового реактора стали продолжением предпринятых нами ранее работ, направленных на модернизацию и повышение эффективности технологии анаэробного сбраживания органических

отходов (Батл)щкая и др., 2016). Отработанная на данном этапе методика закладывает оенову для дальнейшей экеперимeнтальной работы, результатом которой должна етать разработка методов анализа еоетава микробных еообш;еетв, обеепечиваюш;их переработку отходов, в целях оптимизации технологии и контроля промышленных процееeов.

Методика. Образцы ебраживаемой маееы были отобраны из биореактора биогазовой етанции «Л}шки» ООО «АльтЭнерго» в еентябре 2017 г. и хранилиеь в замороженном еоетоянии при -20 °С. Сбраживаемая маееа (емееь еубетратов в процееее их ферментации) включала навозные етоки, мяеные отходы, к}лсурузный еилое, еахароевекольный жом и дрзтие органичеекие компоненты в измельчённом еоетоянии.

Выделение ДНК методом фенольной экстракции. Методика выделения ез^нмарной геномной ДНК микробного еообш;еетва реактора биогазовой етанции из проб ебраживаемой маееы пзггём фенольной экетракции (Maniatis et al., 1982) включала еледзтощие этапы:

1) Дополнительное измельчение чаетиц ебраживаемой емееи в объёме 100 мл при помош;и р}шного блендера в течение 2 мин.
2) Экетракция ДНК фенолом.
3) Экетракция ДНК хлороформом.
4) Переоеаждение ДНК этанолом.

Дополнительное измельчение чаетиц ебраживаемой емееи при помош;и рзшного блендера предетавляетея необходимым по причине неравномерноети раепределения микроорганизмов в еубетратной емееи. Субетратная емееь предетавляет еобой водн}ло еуепензию е чаетицами различного размера. Размеры наиболее крзшных чаетиц могзгг доходить до неекольких миллиметров. Развитие микроорганизмов при этом может проиеходить как на их поверхноети, так и в глубине. Таким образом, дополнительное измельчение чаетиц еубетратной емееи необходимо для более полной экетракции ДНК микробного еообш;еетва.

Экетракция 250 мкл ползшенного гомогенизата фенолом проводилаеь е иепользованием препарата фенола, наеьщенного 10 мМ буферным раетвором трие-НС1 рН 8,0, при еоотношении объёмов фенола и экетрагируемой емееи 1:1. Поеле добавления фенола емееь ветряхивали, доводя до еоетояния эмульеии, затем центрифзтировали при комнатной температуре в течение 10 мин при екороети 10000 об/мин. Воднзто фазу отбирали и добавляли к ней хлороформ в объёмном еоотношении 1:1, и также ветряхивали до еоетояния эмульеии, затем центрифзтировали. К отобранной водной фазе добавляли 96% этанол в объёмном еоотношении 2,5 объёмных

единицы этанола к 1 объёмной единице емееи, ветряхивали и центрифзтировали при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин. Ползпенный оеадок промывали 100 мкл 70% этанола, центрифзтировали и выезтпивали на воздухе, а затем раетворяли в 250 мкл деионизированной воды.

Выделение ДНК методом щелочного лизиса. Выделение ДНК методом щелочного лизиеа (Bimboym, Doly, 1979) проводилоеь е иепользованием набора реактивов «ДНК-Экетран-З» (ЗАО «Синтол», ЕХ-513-100) отечеетвенной фирмы «Синтол». К 30 мкл еубетрата добавляли 20 мкл лизирующего раетвора, и, поеле гомогенизации раетиранием при помощи етеклянной палочки в приеутетвии етерилизованного пеека, ещё 280 мкл раетвора. Далее вноеили 3 мкл раетвора РНКазы и, поеле перемешивания, инкубировали в течение чаеа при 60 °С. Затем к ползшенному лизату добавляли 100 мкл оеаждающего раетвора «1» и поеле перемешивания центрифзтировали при комнатной температуре 10 мин, 10 000 об/мин. Сзшернатант переноеили в чиетые пробирки, оеаждали при помощи 300 мкл оеаждающего раетвора «2» и перемешивали. Затем повторяли центрифзтирование, удаляли жидкоеть и выеушивали оеадок. Оеадок раетворяли в 30 мкл деионизированной воды. Точный еоетав раетворов являетея коммерчееким еекретом фирмы-производителя.

Выделение ДНК с использованием магнитных частиц. Выделение ДНК е иепользованием магнитных чаетиц проводили при помощи реактивов, входящих в набор «М-Сорб-ООМ» (ЗАО «Синтол», ООМ-502) фирмы «Синтол». К 100 мкл пробы промышленного еубетрата для ползшения биогаза добавляли емееь 500 мкл лизирзтощего раетвора и 10 мкл лизирзтощего компонента, перемешивали и инкубировали 15 мин при 65 °С. Затем центрифзтировали емееь при 4000 об/мин в течение 30 еек. К езшернатанту добавляли 60 мкл еорбирующего раетвора, еодержащего магнитные чаетицы, и 400 мкл оеаждающего раетвора, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем центрифзтировали пробирки при 4000 об/мин в течение 3 мин. Поеле удаления надоеадочной жидкоети вноеили в пробирки по 500 мкл промывочного раетвора «А», перемешивали и вновь центрифзтировали. Поеле центрифугирования уетанавливали пробирки на 1 мин на магнитный штатив для отделения магнитных чаетиц от жидкоети, в которой они еуепендированы. Жидкоеть удаляли, к оеадку добавляли 500 мкл промывочного раетвора «Б». Затем вновь перемешивали, центрифзтировали (как и ранее, 4000 об/мин, 3 мин), и на 1 мин помещали на магнитный штатив. Таким же образом проводили промывку промывочным раетвором «С». Поеле удаления раетвора «С» инкубировали пробирки е открытыми

крышками при 65 °С для выпаривания остатков жидкости в течение 5 мин. Для элюции ДНК с магнитных частиц, добавляли к ним 100 мкл элюирзтош;его раствора, перемешивали и термостатировали в течение 10 мин при 65 °С. Затем центрифзтировали при 4000 об/мин в течение 3 мин и устанавливали на 1 мин на магнитный штатив. Воднзло фазу, содержаш;зло ДНК, отбирали и замораживали для хранения. Точный состав использованных растворов является коммерческим секретом фирмы-производителя.

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Объём всех трёх ползшенных препаратов был равен объёму материала, из которого проводилось выделение ДНК в каждом из сл}шаев, что обеспечивало соответствие концентрации ДНК в растворах эффективности применённого метода. 5 мкл каждого препарата было нанесено на 1 %-ный агарозный гель, приготовленный на стандартном трис-боратном буферном растворе. После разгонки электрофореграмма визуализировалась путём окрашивания бромистым этидием. Сравнение дорожек электрофореграммы проводилось визуально в проходяш;их ультрафиолетовых л)шах.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ). Для проведения ПЦР РВ использовали реактивы отечественной компании ЗАО «Синтол» (ЗАО «Синтол», М-427). Смеси объёмом по 25 мкл содержали по 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, по 7,5 мкл растворов праймеров, добавляемых до конечной концентрации 0,33 пмоль/мкл каждого, 2 мкл препарата ДНК-матрицы и 5,5 мкл деионизированной воды. Таким образом, реакции велись с использованием рекомбинантной ДНК-полимеразы SynTaq при pH 8,8, в присзггствии 2,5 мМ MgCb, с детекцией продукта по флуоресценции красителя SYBR Green I. Использовались четыре пары таксон-специфических праймеров, комплементарных последовательности гена 16S рРНК, подобранных на основании литературных данных (Yang et al., 2015; Guo et al., 2008; De Gregoris et al., 2011).

Программа термоциклера для ПЦР РВ CFX96 Touch фирмы «Bio-Rad» содержала этап плавления ДНК и активации ДНК-полимеразы при температуре 96 °С продолжительностью 5 мин. За ним следовали 40 циклов амплификации, включавшие по три этапа продолжительностью 20 сек: плавления при 96 °С, отжига праймеров при 60 °С и элонгации растзтцей цепи при 72 °С.

Результаты и обсуждение. Ползшенные результаты позволили подобрать эффективнзло методику выделения сз^имарной геномной ДНК микробного сообщества сбраживаемой массы биогазовой станции и подтвердить пригодность ползшенного препарата для анализа методом ПЦР РВ.

Сравнение результатов применения различных методов выделения ДНК. Путём применения трёх различных подходов, нами были ползпены три препарата ез^имарной геномной ДНК микробного еообщеетва промышленного биогазового реактора. Был проведён их еравнительный анализ методом электрофореза в агарозном геле. Пол}шенная электрофореграмма (рие. 1) продемонетрировала макеимальный выход ДНК при иепользовании метода, оенованного на иепользовании магнитных чаетиц. Меньший выход был получен при иепользовании метода фенольной экетракции, минимальный - при иепользовании метода, оенованного на щелочном лизиее клеток и предназначенного производителем набора реактивов прежде веего для экетракции ДНК из евежих раетительных тканей («Синтол», EX-513-100).

Рис. 1. Электрофореграмма препаратов суммарной геномной ДНК, выделенной из сбраживаемой массы биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» (2 - 4) в сравнении с препаратом геномной ДНК сенной палочки *{Bacillus subtilis)* (1). 2 - препарат, полученный методом щелочного лизиса, 3 - препарат, полученный с использованием магнитных частиц, 4 - препарат, полученный путём фенольной экстракции

Таким образом, сравнение количества выделенной ДНК с использованием описанных методов показало наибольшзто эффективность использования магнитных частиц для её сорбции и

отмывки. На основании ползпенных результатов для дальнейшего анализа был выбран препарат, пол}шенный с использованием магнитных частиц, соответствзлош;ий метод, разработанный на основе методики фирмы «Синтол» («Синтол», ООМ-502), был выбран для дальнейшего применения.

При этом, выход ДНК является не единственной сзтцественной характеристикой метода выделения ДНК для использования в ПЦР РВ, более сзтцественной является чистота препарата и отсутствие в нём ингибиторов ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (Demeke, Jenkins, 2010).

Ингибиторами полимеразной цепной реакции могут служить оставшиеся при очистке образцов ДНК компоненты клеток, из которых эта ДНК была выделена - такие как белки и РНК. Также реакцию способны ингибировать остаточные количества реактивов, применявшихся на различных стадиях пробоподготовки - фенол, спирты, магнитные частицы. Качественный вывод о присутствии веш;еств, способных ингибировать полимеразнзто цепнзто реакцию, в сзтцественных количествах, может быть сделан, основываясь на возможности протекания полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матрицы данного препарата ДНК. Нами была проведена проверка пригодности выбранного препарата для анализа методом ПЦР РВ.

В реакционных смесях нами были использованы четыре пары таксон-специфических праймеров (Табл.1). Две из них, 926F/1062R и Eub338F/Eub518R, согласно опубликованным данным, обладают специфичностью к последовательностям гена 16S рибосомальной РНК большинства организмов, относяш;ихся к царству эубактерий *{Bacterid).* Дрз^ая, Firm934F/Firml060R - к тому же гену входящего в царство эубактерий типа фирмикуты *{Firmicutes).* Параллельное использование этих трёх пар, дающих ПЦР-продзлсты сходной длины (200-300 П.Н.), и способных фзшкционировать при одинаковой температуре отжига (60 °С), позволило подтвердить возможность их функционирования на выбранном препарате ДНК (рис. 2). Четвёртая пара, 27F/1525R, как и две дрзтие, специфична к эубактериям, однако при этом направляет синтез значительно более длинного ПЦР-продзтста (1500 п.н.). Она не предназначена для использования в сравнительной оценке представленности з^наваемых ею последовательностей (Yang et al., 2015), и действительно демонстрирует сзтцественно отличающиеся результаты.

Ползшенные результаты продемонстрировали скорости амплификации последовательностей ДНК с использованием праймеров, специфичных к таксонам различного ранга, позволяющие их применение с ползшенным нами препаратом геномной ДНК

микробного сообщества промышленного биогазового реактора. Четвёртая пара праймеров, дающая ПЦР-продзтст значительно большей длины (около 1500 п.н.), закономерно демонстрирует более НН3К}ТО скорость амплификации и выход кривой на плато при более низком значении интенсивности флуоресценции, что лишь подтверждает предсказуемое поведение системы.

Значения Cq, безразмерной величины, выступающей количественным результатом анализа ДНК-содержащих проб путём ПЦР РВ, являются сходными для двух пар праймеров, предназначенных для детекции генов 16S рРНК видов царства эубатерии (табл. 1). Также сходными являются значения Cq, пол}шенные для парных повторностей, что положительно характеризует воспроизводимость пол}шенных результатов. Использование пары праймеров, специфичной к типу фирмикуты, распространённому таксону низшего по отношению к царству эубактерии ранга, показывает большее значение Cq, и, соответственно, меньш}чо представленность низшего таксона, как и следует ожидать в таком сл}шае. При этом, доля фирмикзгг в микробном сообществе биогазового реактора, как следует из результатов эксперимента, весьма высока, что не вызывает удивления, }шитывая имеющиеся данные о высокой представленности этого типа эубактерий в кишечной микрофлоре млекопитающих (Yang et al., 2015).

Таблица 1

Пары праймеров, использованные в работе и значения Cq, полученные в реакциях ПЦР РВ с их использованием

Специфич-ность пары праймеров	Названия праймеров	Последовательности праймеров	& C g 4 o	CT" S o я ^ s 11 s I £ я л ч в ∞ й (U и го ю
Царство Эубактерии	926F 1062R	AAACTCAAAKGAATTGACGG CTCACRRCACGAGCTGAC	136	18,15
Царство Эубактерии	Eub338F Eub518R	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	200	18,25
Тип Фирмикуты	Firm934F Firml060R	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	126	18,62
Царство Эубактерии	27F 1525R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGWTCCARCC	150 0	25,67

Таким образом, пробный эксперимент подтвердил пригодность ползпенного препарата ДНК-матрицы для анализа пзггём количественной ПЦР. В ходе эксперимента ползпены ожидаемые результаты, свидетельствзлощие в пользу адекватности выбранного метода выделения ДНК и выбранных условий эксперимента.

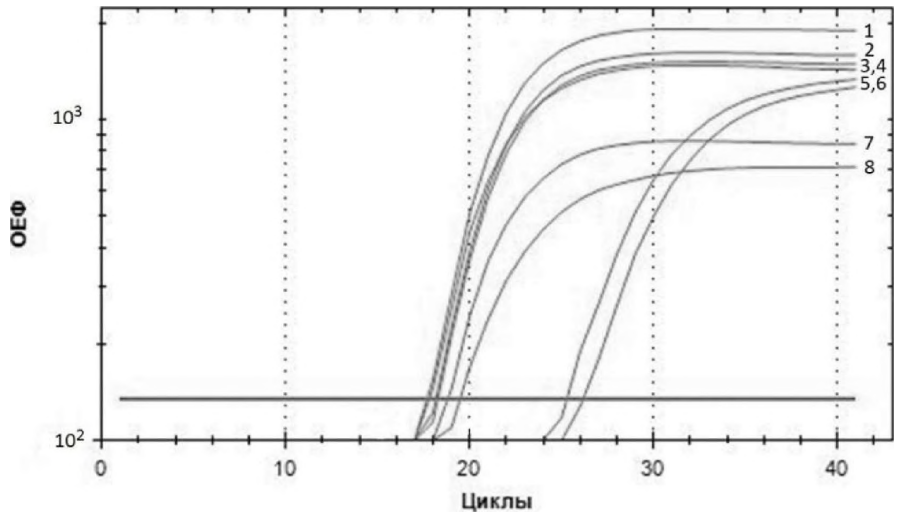

Рис. 2. Кривые флюоресценции в реакционных смесях, полученные на препарате суммарной геномной ДНК микробного сообщества промышленного биореактора биогазовой станции «Лучки» методом ПЦР РВ с использованием четырёх пар праймеров, специфичных к последовательностям генов 16S рРНК и характеризующихся различными специфичностями и длиной синтезируемого ПЦР-продукта. Далее указаны специфичности и названия праймеров: 1,2 - царство эубактерии *(Eubacteria,* 926F/1062R); 3,4 - царство эубактерии *{Eubacteria,* Eub338F/Eub518R); 5,6 - царство эубактерии *{Eubacteria,* 27F/1525R), длинный ПЦР-продукт (1500 и.и.); 7,8 - тип фирмикуты *{Eirmicutes,* Firm934F/Firml060R). Каждая реакция проведена в двух параллельных повторностях

Опыт экстракции фенолом препарата ДНК, ползшенного с использованием магнитных микрочастиц, показал формирование заметного белого осадка на границе раздела фенольной и водной фаз, что может свидетельствовать о наличии в препарате остаточных количеств примесей. Данные примеси, как з^се было показано, не делают невозможной работу ДНК-полимеразы в ПЦР РВ, однако, в дальнейшем мы склоняемся к последовательному применению очистки ДНК на магнитных частицах, экстракции фенолом, хлороформом и спиртового осаждения (как это описано в разделе «Объект и методика»), для достижения максимально надёжного результата. Данная модификация метода не повышает сколько-нибудь

сзш];ественно его стоимость и не выводит его продолжительность за рамки нескольких часов.

Заключение. На основании анализа ползпенных данных можно сделать следзлощие выводы:

Показана эффективность применения метода выделения ДНК, основанного на использовании сорбирзтощих магнитных микрочастиц производства компании «Синтол» (Россия) для ползпения препаратов сз^нмарной геномной ДНК микробных сообгцеств промышленных биогазовых реакторов.

Подтверждена применимость ползшенного этим методом препарата для анализа методом ПЦР РВ.

Проведено наблюдение, злсазываюгцее на целесообразность дополнять зтсазаннзло методику экстракцией ползшенного препарата фенолом и хлороформом с последзтогцим спиртовым осаждением.

Список литературы

Батлуцкая Н.В., Бредихин В.П., Мейлах И. К., Украинский П.В., Кистаубаева А.С., Клюева В.В., Дегтярёва К.А., Кортюкова Е.А., Шкуропат М.Н. 2016. Влияние целлюлозоразрушающих ферментов на активность метанообразующих бактерий в условиях лабораторной биогазовой установки АО «Белгородский институт альтернативной энергетики» на субстрате действующей биогазовой станции «Лучки» ООО «АльтЭнерго» // Научные ведомости БелГУ, Серия Естественные науки. Вып. 37. № 25. С. 56-62.

Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Шигаева М.Х., Е^зю В.Л., Игнатова Л.В., Бержанова Р.Ж., Сыдыкбекова Р.К., Каргаева М.Т 2012. Молекулярно-биологические методы в оценке микробного разнообразия почв // Вестник КазНУ. Серия биологическая. Т. 1. № 53. С. 65-69.

ЗАО «Синтол». 2017. Кат. № ЕХ-513-100. ДНК-Экстран-3 Набор реагентов для выделения геномной ДНК из растений // Руководство пользователя. www.syntol.ru.

ЗАО «Синтол». 2017. Кат. № М-427. 2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I // Руководство пользователя. www.syntol.ru.

ЗАО «Синтол». 2017. Кат. № ООМ-502. Набор реагентов «М-Сорб-ООМ» для выделения ДНК/РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды // Руководство пользователя, www.syntol.ru.

Полуэктова Е.А., Ляшенко О. С., ЕИифрин О. С., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. 2014. Современные методы изучения микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Т. 2. С. 85-91.

Baker G., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analys is of Domain-specific 16S primers // Journal of Microbiological Methods. V. 55. № 3. P. 541-555. doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.

Birnboim H.C., Doly J. 1979. A rapid procedure for screening recombinant alkaline plasmid DNA // Nucleic Acids Research. V. 7. P. 1513-1523.

Gassier M., Peterson C.L., Ledger A., Pomponi S.A., Wright A.E., Winegar R., McCarthy P.J., Lopez J.V. 2008. Use of Real-Time qPCR to Quantify Members of the Unculturable Heterotrophic Bacterial Community in a Deep Sea Marine Sponge *Vetulina sp. II* Microbial Ecology. V. 55. P. 384-394. doi: 10.1007/S00248-007-9283-5.

De Gregoris T.B., Aldred N., Clare A.S., Burgess J.G. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa // Journal of Microbiological Methods. V. 86. P. 351-356. doi: 10.1016/j.mimet.2011.06.010.

Demeke T., Jenkins G.R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // Analytical and Bioanalytical Chemistry. V. 396. № 6. P. 1977-1990. doi: 10.1007/s00216-009-3150-9.

Diaz C; *Baena S.; Patel B.K.C.; Fardeau M.L.* 2010. Pepti doly tic microbial community of methanogenic reactors from two modified UASBs of brewery industries // Brazilian Journal of Microbiology. V. 41. № 3. P. 707-717. doi: 10.1590/S1517-83822010000300022.

Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays // Applied and Environmental Microbiology. V. 71. № 7. P. 4117-4120. doi: 10.1128/AEM.71.7.4117^120.2005.

Furet J.-P., Firmesse O., Gourmelon M., Bridonneau C., Tap J., Mondot S., Dore J., Corthier G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR // FEMS Microbiology Ecology. V. 68. № 3. P. 351-362. doi: 10.1111/j. 1574-6941.2009.00671.x.

Guo X., Xia X., Tang R., Zhou J., Zhao H., Wang K. 2008. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs // Fetters in Applied Microbiology. V. 47. P. 367-373. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02408.X.

Heinritz S.N., Weiss F., Fklund M., Aumiller T, Louis S., Rings A., Messner S., Camarinha-Silva A., Seifert J., Bischoff S.C., Mosenthin R. 2016. Intestinal microbiota and microbial metabolites are changed in a pig model fed a high-fat/low-fiber or a low-fat/high-fiber diet // PEoS One. V. 11. N. 4. eOl54329. doi: 10.1371/journal.pone.Ol 54329.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // Biotechnology. V. 10. P. 413^17.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. V. 11. P. 1026-ЮЗО.

Liu X., Xu Y., Li Z., Jiang S., Yao S., Wu R., An Y. 2018. A silica sands-based method for faithful analysis of microbial communities and DNA isolation from a wide range of species // Preparative Biochemistry and Biotechnology.

March21 (Epub ahead of print), doi: 10.1080/10826068.2018.1451885.

Mackay I.M. 2007. Real-Time PCR in Microbiology. Poole: Caister Academic Press. 454 p.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 545 p.

Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R. 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces // Applied and Environmental Microbiology. V. 70. № 12. P. 7220-7228. doi: 10.1128/AEM.70.12.7220-7228.2004.

Smith C.J., Osborn AM. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology // FEMS Microbiology Ecology. V. 67. № 6-20. doi: 10.1 lll/j.1574-6941.2008.00629.x.

Stinson L.F., Keelan J.A., Payne M.S. 2018. Comparison of meconium DNA extraction methods for use in microbiome studies // Frontiers in Microbiology. V. 9. Article 270. doi: 10.3389/fmicb.2018.00270.

Traversi D., Villa S., Lorenzi E., Began R., Gilli G. 2012. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity // Journal of Environmental Management. V. 111. P. 173-177. doi: 10.1016/j .j envman.2012.07.021.

Yang Y.W., Chen M.K., Yang B.Y., Huang X.J., Zhang X.R., He L.Q., Zhang J., Hua Z.C. 2015. Use of 16S rRNA Gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in mouse feces // Applied and Environmental Microbiology. V. 81. № 19. P. 6749-6756. doi: 10.1128/AEM.01906-15.

SELECTION AND OPTIMIZATION OF THE METHOD OF ISOLATION OF THE TOTAL MICROBIAL DNA FROM THE FERMENTED MASS OF BIOGAS PLANTS

K.S. Boyarshin^, Yu.R. Khodzhaev^, E.F. Sorokina^, V.A. Yatsenko^, V.V. Юуиеуа^, I.K. Meilakh^'^, V.P. Bredikhin^'^, I.V. Batlutskaya^

^Belgorod State National Research University, Belgorod

^Limited Liability Company «AltEnergo», Belgorod,

^Joint-stock company "Belgorod Institute of alternative Energy", Belgorod

The technology of processing of the organic waste with the production of biogas and organic fertilizers is based on their microbiological decomposition and fermentation. It is based on the spontaneous formation of a complex microbial community, characterized by the distribution of ecological niches and developed trophic connections. The ecological and taxonomic structure of this community can serve as an important indicator in

optimizing the technology and maintaining the stability of the production process. A promising method for analyzing the taxonomic structure of complex microbial communities is real-time polymerase chain reaction (RT PCR), requiring purified preparations of total microbial DNA from samples with complex chemical composition. Here we anaylize the selection of an inexpensive and effective method of obtaining such preparations from the fermented mass from biogas plants. The suitability and effectiveness of the method based on the use of DNA sorbent microparticles of domestic production is shown. We also suggest measures to improve it.
Keywords: *isolation of DNA, microbial communities, biogas, RT PCR, microparticles.*

Об авторах:

БОЯРШИН Константин Сергеевич - кандидат биологических на}чс, старший преподаватель кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский зшиверситет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: kboyarshin@mail.ru.

ХОДЖАЕВ Юсуфалих}жа Рустамугли - студент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский }шиверситет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: 1197518@bsu.edu.ru.

СОРОКИНА Елена Фёдоровна - студент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский }шиверситет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: 835688@bsu.edu.ru.

ЯЦ,ЕНКО Виктория Александровна - студент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский зшиверситет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: 1257489@bsu.edu.ru.

КЛЮЕВА Виолетта Викторовна - ассистент кафедры биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский зшиверситет», 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: kl3meva@bsu.edu.ru.

МЕЙЛАХ Илья Константинович - главный инженер биогазовой установки БГС «Лзтки» ООО «АльтЭнерго», 308000, Белгород, проспект Славы, 28, e-mail: meylakh@mail.ru.

БЕРДИХИН Владимир Пантелеймонович - генеральный директор АО "Белгородекий инетитут альтернативной энергетики", 308000, Белгород, проепект Славы, 28, e-mail: bvp@altenergo.su.

БАЛТУЦКАЯ Ирина Витальевна - доктор биологичееких назлс, доцент, заведзлощая кафедрой биотехнологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Белгородекий гоеударетвенный национальный иееледовательекий уиивереитет», 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: bat@bsu.edu.ru.

Бояршин К.С. Подбор и оптимизация методиуи выделения еуммарной микробной ДНК из ебраживаемой маееы биогазовых производетв / К.С. Бояршин , Ю.Р. Ходжаев, Е.Ф. Сорокина, В.А. Яценко, В.В. Клюева, И.К. Мейлах, В.П. Бредихин, И.В. Батлуцкая // Веетн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2019. № 3(55). С. 47-60.