

© Е. В. Коростик^{1,2},
А. Г. Пинаев¹, Г. А. Ахтемова¹,
Е. Е. Андронов¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург.

² Санкт-Петербургский государственный университет: кафедра микробиологии, Санкт-Петербург.

✳ Были сконструированы и испытаны универсальные праймеры BD1 для гена 16S рРНК. Данные праймеры позволяют достоверно определять таксономическую принадлежность бактерий, а при анализе микробных популяций в почве дают возможность выявлять исключительно высокий уровень разнообразия последовательностей гена 16S рРНК. В составе библиотеки 16S рДНК дерново-подзолистой почвы (190 клонов) было идентифицировано 160 генетических типов.

✳ **Ключевые слова:** праймеры, 16S рРНК, почва, микробное сообщество

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ 16S рРНК ПРАЙМЕРЫ BD1 ДЛЯ ОПИСАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СООБЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ ПРОКАРИОТ

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие, в результате применения в микробиологической практике методов выделения общей ДНК непосредственно из окружающей среды и скрининга библиотек клонированных генов, были получены уникальные данные по составу и функционированию сообществ микроорганизмов окружающей среды [12]. В исследованиях подобного рода особое внимание уделяется именно почве, как одной из наиболее сложных по своей структуре и малоизученных природных систем [4, 10, 14]. При этом встает ряд трудноразрешимых проблем, связанных, в том числе, и с методическими аспектами исследования, такими как выбор оптимальной методики выделения ДНК из гетерогенных по своему составу местообитаний, конструирование универсальных праймеров, позволяющих получить наиболее достоверные результаты по идентификации различных филогенетических групп микроорганизмов и многие другие.

На каждой из ступеней анализа почвенных микробных сообществ существует проблема «предпочтения» или «склонности» (bias) по отношению к определенным группам микроорганизмов. Так, при выделении общей ДНК из почвы использование ряда методов приводит к неполной представленности в конечном препарате ДНК групп микроорганизмов с прочной клеточной стенкой или спор [8]. Наиболее значительные проблемы возникают из-за предрасположенности «универсальных» праймеров на ген 16S рРНК к определенным филогенетическим группам. Это приводит к тому, что в общем амплификате отдельные группы микроорганизмов находятся в значительном избытке по сравнению с их реальной долей в почвенном сообществе, в то время как для других групп справедливо обратное.

В настоящей работе представлены результаты конструирования и первого этапа испытаний новых универсальных праймеров BD1 для гена 16S рРНК. Несмотря на то, что к настоящему времени число таких праймеров, используемых в работах по оценке биоразнообразия исчисляется несколькими десятками [2, 5, 11], актуальность данной проблемы не исчезает. Это легко понять, приняв во внимание исключительно высокое разнообразие типов гена 16S рРНК, принадлежащих микроорганизмам из широкого спектра таксономических категорий.

Важно отметить, что праймеры BD1 были сконструированы с использованием новых, очень продуктивных компьютерных подходов, обеспечивающих комплексный анализ групп последовательностей. В результате такого анализа выявляются не только наиболее консервативные участки гена, но участки, одновременно и консервативные, и удовлетворяющие основным требованиям, предъявляемым к праймерам. При конструировании праймеров в число выравниваемых последовательностей были включены несколько представителей домена Archaea (70 последовательностей Bacteria и 10 последовательностей Archaea). Таким образом, авторы предполагали более точную идентификацию консервативных участков гена 16S рРНК, что позволило бы обеспечить высокую степень «универсальности» праймеров.

МЕТОДИКА

Конструирование универсальных праймеров для гена 16S рРНК

Для конструирования праймеров были отобраны 80 последовательностей гена 16S рРНК бактерий и архей — представителей 22 фил: *Aquificae*,

Thermotogae, Thermodesulfobacteria, Deinococcus-Thermus, Chrysiogenetes, Chloroflexi, Thermomicrobia, Nitrospira, Deferribacteres, Cyanobacteria, Chlorobi, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes, Fibrobacteres, Acidobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes. Всего — 70 последовательностей бактерий и 10 — архей. Выравнивание последовательностей осуществлялось с использованием программы ClustalX [16]. Файл, содержащий выровненные последовательности был использован для конструирования вырожденных праймеров в программе Primer Premier 5 (Premier Biosoft, USA). Всего было сконструировано три пары праймеров, которые были испытаны во всех возможных комбинациях. Наилучшая комбинация была названа BD1 (Bacterial Diversity) и состояла из прямого праймера (fBD1): 5'—**НААТНУГТГССАГСАГС**—3' и обратного праймера (rBD1): 5'—**ГТСТССТССТССТС**—3'. При использовании этой пары происходит амплификация относительно короткого, гипервариабельного участка (около 700 п. н.) гена 16S рДНК (508–1191 нуклеотидные позиции в соответствии с геном 16S рРНК *Escherichia coli*).

Выделение ДНК из чистых культур модельных штаммов и амплификация гена 16S рРНК

В качестве модельных микроорганизмов использовались чистые культуры бактерий из музейной коллекции ГНУ ВНИИСХМ (*Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *Lactobacillus buchneri*, *Anabaena* sp., *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas* sp., *Azospirillum lipoferum*), культуры почвенных бактерий, выделенных из дерново-подзолистой почвы опытного поля ГНУ ВНИИСХМ с использованием агаризованной глюкозо-пептонной среды (глюкоза — 1 г, пептон — 1 г, дрожжевой экстракт — 1 г, K_2HPO_4 — 1 г, H_2O — 1 л.) — штаммы 01, 02, 03, 04, а также изолят с покровов тела человека (штамм 05), выделенный на среде LB [15]. ДНК трех штаммов архей из коллекции биоцентра университета Хельсинки, Финляндия (*Methanogenium frigidum*, *Halobacterium salinarum*, *Methanococcoides burtoni*) была любезно предоставлена Германом Юргенсом.

Культивирование проводилось при 28°C. ДНК была выделена из ночных культур модельных штаммов в соответствии со стандартной методикой [15]. Полученная ДНК использовалась в качестве матрицы в двух реакциях амплификации участка гена 16S рРНК с праймерами BD1 и с праймерами fD1/rD1 (прямой праймер (8–27f): 5'—**АГАГТТТГАТСТГГСТСАГ**—3'; обратный праймер (1541–1525r): 5'—**ААГГАГГТГАТССАГСС**—3') [18]. Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе iCycler (**Bio-Rad, США**) в следующем режиме: начальная денатурация при 95°C — 3 мин., 30 циклов, 94°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 1 мин, завершающий синтез — 72°C — 20 мин. Во всех реакциях была использована

на Taq-полимераза (**Хеликон, Москва**). Полученные ПЦР-продукты были клонированы в векторе рTZ57R (**Fermentas, Ломва**) с использованием химически-компетентных клеток *E. coli*, штамм DH10β [15].

Отбор почвенных образцов

Отбор образцов дерново-подзолистой почвы проводился в мае 2005 года на территории опытного поля ГНУ ВНИИСХМ. Для этого на поле было выбрано 10 площадок, расположенных на одинаковом расстоянии друг от друга, с каждой площадки был удален верхний почвенный горизонт (3–5 см) и отобраны образцы почвы пахотного слоя (15–20 см). В лаборатории производили смешивание и отбор образцов (по 10 г почвы каждый), которые в течение месяца хранились при –70°C.

Получение библиотеки генов 16S рРНК

Выделение ДНК проводилось из одной порции замороженного образца (10 г) в экстрагирующем SDS-содержащем буфере при интенсивном встряхивании со стеклянными шариками размером 0,3 мм в соответствии со стандартным протоколом [19]. Выделенная ДНК использовалась в качестве матрицы в ПЦР с праймерами BD1. Полученный амплификат был клонирован в векторе рTZ57R. Рестрикционный анализ 16S рДНК отдельных клонов проводился с использованием пяти различных эндонуклеаз рестрикции: *HpaII*, *RsaI*, *TaqI*, *MboI* и *HaeIII* (**Fermentas, Ломва**). Для рестрикционного анализа использовались фрагменты гена 16S рРНК, полученные при реамплификации вставок с использованием стандартных праймеров M13F/M13R. После проведения электрофореза в 4 % агарозном геле, идентификация сходных рестрикционных профилей (рестрикционных типов) проводилась визуально.

Определение таксономического положения модельных штаммов микроорганизмов и доминирующих типов

Секвенирование клонированных фрагментов гена 16S рРНК осуществлялось с использованием набора реагентов фирмы **Beckman Coulter (США)** на автоматическом капиллярном секвенаторе SEQ8000 в соответствии с рекомендациями изготовителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивались с последовательностями базы данных GeneBank с помощью программы BLAST [1].

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ из пакета Excel (Microsoft, USA), Rarefaction тест был проведен в соответствии со стандартной методикой [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Праймеры BD1 были испытаны на образцах ДНК, выделенных из чистых культур бактерий и архей. В кон-

трольном эксперименте те же образцы служили в качестве матричной ДНК при амплификации с использованием праймеров fD1/rD1, традиционно используемых при идентификации бактерий. Таким образом, было проведено сравнение этих двух пар праймеров в экспериментах по амплификации фрагментов гена 16S рРНК. Для этого исследования были отобраны 14 штаммов бактерий (см. раздел «Методика»).

При использовании обоих пар праймеров для ПЦП с температурой отжига 55°C амплифицированные фрагменты ДНК заданной длины наблюдались исключительно для бактерий. Вместе с тем, при снижении температуры отжига до 48°C слабые положительные ответы ожидаемого размера с использованием праймеров BD1 были получены не только для бактерий, но и для архей, в то время как для праймеров fD1/rD1 таких ответов получено не было.

При сравнении результатов идентификации бактерий с использованием праймеров fD1/rD1 с результатами, полученными для праймеров BD1, было установлено, что все исследуемые первичные последовательности принадлежат 16S рДНК и результаты определения таксономического положения модельных штаммов с использованием обоих пар праймеров совпадают (табл. 1).

Эффективность применения праймеров BD1 в экологических исследованиях была проверена в ходе анализа микробного сообщества дерново-подзолистой почвы.

Скрининг библиотеки клонированных фрагментов генов 16S рРНК проводился посредством рестрикционного анализа с пятью различными эндонуклеазами рестрикции (*HpaII*, *RsaI*, *TaqI*, *MboI* и *HaeIII*). Все перечисленные эндонуклеазы узнают тетрамерные нуклеотидные последовательности и дают достаточное для типирования количество фрагментов рестрикции [9, 13]. Наибольшим числом полученных в ходе рестрикции фрагментов характеризовались *HaeIII* (до 7 фрагментов) и *HpaII* (до 6 фрагментов).

16S рДНК, имеющие одинаковую картину расположения фрагментов рестрикции, объединялись в один рестрикционный тип. По результатам анализа было выявлено 160 индивидуальных рестрикционных типов. Для наглядного представления динамики накопления новых рестрикционных типов в ходе анализа библиотеки клонов, с помощью теста rarefaction был построен график, представленный на рисунке.

Несмотря на то, что большинство рестрикционных типов в полученной библиотеке представлены в единственном экземпляре, в сообществе можно выделить ряд типов, являющихся претендентами на доминирование (объединяющих от 3 до 5 клонов). Для определения их таксономического положения было проведено секвенирование соответствующих последовательностей. При характеристике каждого из пяти доминирующих типов, были определены

Таблица 1

Идентификация модельных штаммов по последовательностям 16S рДНК и сравнение результатов, полученных с использованием праймеров fD1/rD1 и BD1

№	Исходные данные о таксономическом положении микроорганизма	Результаты идентификации по гену 16S рРНК	fD1/rD1	BD1
1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	+	+
2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
3	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	+	+
4	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	+
5	<i>Anabaena</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp.	+	+
6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	+
7	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	+	+
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+
9	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+	+
10	<i>Methanococcoides burtoni</i>	Не идентифицирован	—	—
11	<i>Methanogenium frigidum</i>	Не идентифицирован	—	—
12	<i>Halobacterium salinarum</i>	Не идентифицирован	—	—
13	Почвенный изолят 1	<i>Chrizobacterium</i> sp.	+	+
14	Почвенный изолят 2	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	+
15	Почвенный изолят 3	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+
16	Почвенный изолят 4	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+
17	Изолят с покровов тела человека	<i>Brevibacterium</i> sp.	+	+

Таблица 2

Результаты идентификации доминирующих генетических типов

№ типа	Номер клона	Систематическое положение ближайшего гомолога по результатам BLAST	% сходства	Номер ближайшего гомолога в базе данных BLAST
1	110	<i>Holophaga</i> sp. (<i>Acidobacteria</i>),	98	AY536875
	245	<i>Acidobacterium</i> sp. (<i>Acidobacteria</i>)	97	AY921919
2	116	<i>Flavobacterium</i> sp. (<i>Bacteroidetes</i>)	98	AY942941
	282		94	
3	300	<i>Bacteroidetes</i>	99	DQ201671
4	171	<i>Xiphinematobacteriaceae</i> (<i>Verrucomicrobia</i>)	99	AY395477
	172		89	
	79		98	
5	202	<i>Acidobacteriaceae</i> (<i>Acidobacteria</i>)	99	DQ263483

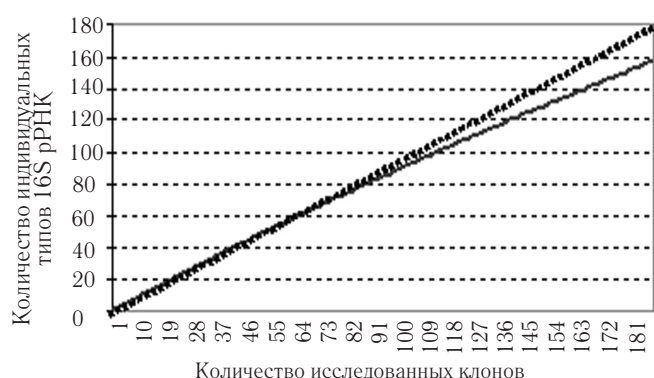


Рис. Зависимость числа выявляемых новых типов 16SpPHK от числа проанализированных клонов. Пунктиром обозначена прямая, соответствующая теоретическому максимуму разнообразия

нуклеотидные последовательности нескольких клонов (тип 1 — клоны 110 и 245, тип 2 — клоны 116 и 282, тип 3 — клон 300, тип 4 — 171, 172 и 79, тип 5 — клон 202). Результаты идентификации приведены в таблице 2.

Все идентифицированные бактерии являются, по всей видимости, некультивируемыми и принадлежат к трем филум: *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ключевым моментом, определяющим точность и специфичность амплификации гена 16S рРНК, является выбор праймеров. Одними из первых предложенных универсальных праймеров были праймеры fD1/rD1. Они позволяют амплифицировать практически всю последовательность гена 16S рРНК (1497 п.н.) и были разработаны на основе анализа последовательностей 16S рДНК патогенных бактерий в целях ускорения диагностики инфекционных заболеваний [18]. Поскольку в период с 1990 по 2006 год произошли значительные изменения в базах данных

16S рДНК, возникла необходимость в создании новых праймеров, которые позволили бы в ходе молекулярно-генетических исследований природных популяций выявлять как можно больше существующих на данный момент групп прокариот. К настоящему времени было предпринято большое количество новых попыток сконструировать универсальные праймеры на ген 16S рРНК [2, 5]. Однако в своих исследованиях авторы, как правило, ограничивались тестированием разработанных праймеров на различных группах прокариот, представленных в виде чистых культур [11]. При этом выборки ограничивались несколькими десятками штаммов, относящихся к культивируемым микроорганизмам, принадлежащим к различным, но далеко не всем известным на данный момент таксонам. По мнению авторов данного исследования при создании универсальных праймеров и их оценке необходимо проводить эксперименты по амплификации ДНК, выделенной из природных популяций микроорганизмов, отличающихся высоким разнообразием. Реальная оценка степени «универсальности» праймеров может быть проведена лишь при секвенировании сотен клонов, полученных при использовании различных праймеров. Сравнение таксономического разнообразия в таких библиотеках позволит выявить те комбинации праймеров, которые позволяют выявлять максимальное количество таксономических групп.

В настоящем исследовании была предпринята новая попытка сконструировать универсальные праймеры на ген 16S рРНК для анализа природных популяций микроорганизмов. Полученные результаты указывают на то, что степень «универсальности» праймеров BD1 может оказаться исключительно высокой. Во-первых, об этом свидетельствует близость кривой, полученной в результате rarefaction анализа к ее теоретическому максимуму, а во-вторых, наличием амплификата (хотя и слабого) при ПЦР с ДНК архей. Кроме того, праймеры BD1 обладают рядом технологических преимуществ. В частности, за счет

меньшей длины амплифицируемого участка (700 п. н.), по сравнению с соответствующим участком для праймеров fD1/rD1 (1500 п. н.), происходит увеличение эффективности амплификации. Поскольку при секвенировании на современном оборудовании за один проход возможно прочтение последовательности состоящей не более чем из 700 нуклеотидов, короткий фрагмент гена 16S рПНК будет проанализирован полностью и по обеим цепям за один проход, что повышает точность и скорость анализа первичной последовательности. Достоинством данных праймеров также является то, что они фланкируют один из гипервариабельных участков гена 16S рПНК, что способствует высокой точности таксономического анализа.

В ходе анализа микробного сообщества дерново-подзолистой почвы с использованием праймеров BD1 для амплификации гена 16S рПНК было выявлено крайне высокое генетическое разнообразие (из 190 исследованных клонов, 160 несли в составе плазмиды уникальные последовательности 16S рДНК, рисунок).

Из приведенных данных видно, что разнообразие в сообществе не только не будет ограничено 160 генетическими типами, но и не имеет видимой тенденции к насыщению. Вполне возможно, что предполагаемое число клонов, необходимых для учета всех генотипов в исследуемом сообществе, может достигать нескольких сотен. Вместе с тем, в значительной части работ, посвященных изучению генетического разнообразия почвенных прокариот с использованием классических праймеров fD1/rD1, выход кривой на плато наблюдается уже при анализе 200–250 клонов [6, 17, 20]. В нашем случае, даже при анализе 190 клонов, существенного изменения в динамике накопления новых типов рестрикционных профилей не наблюдается (рисунок).

В целом, исследуемое сообщество характеризуется высоким разнообразием и большим количеством минорных групп. По всей видимости, такая картина ранжированного распределения микроорганизмов является одной из наиболее значимых характеристик микробных ценозов почвы. Возможно, это связано с тем, что почва является гетерогенной средой обитания, включающей множество контрастных по своим физико-химическим условиям экологических ниш (аэробная и анаэробная зоны почвенных комочков, различный уровень значений pH и температуры и др.). Помимо этого, в почве содержится широкий спектр различных по своей физико-химической структуре источников углерода и энергии, что обуславливает наличие узкоспециализированных групп микроорганизмов, тесно взаимодействующих друг с другом и обеспечивающих оптимальное функционирование сложных трофических систем.

В заключении необходимо отметить, что проведенная нами оценка праймеров BD1 является лишь первым этапом данной работы. В дальнейшем предполагается провести секвенирование целой библиотеки клонов и проанализировать таксономическое распределение выявленных последовательностей.

Работа финансировалась грантом РФФИ 06-04-49785 и грантом CRDF BRHE 4056.

Литература

1. *Altschul S. F.* Basic local alignment search tool / Altschul S. F., Gish W., Miller W. [et al.] // *J. mol. biol.* — 1990. — N 215. — P. 403–410.
2. *Baker G. S.* Review and re-analysis of domain-specific 16S primers / Baker G. S., Smith J., Cowan D. A. // *J. Microbiol. Methods.* — 2003. — N 55. — P. 541–555.
3. *Chao A.* Nonparametric estimation of the number of classes in a population / Chao A. // *Scandinavian J. Stat.* — 1984. — N 11. — P. 265–270.
4. *Dunbar J.* Assessment of microbial diversity in four United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis / Dunbar J., Ticknor L. O., Kuske C. R. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — Vol. 66, N 7. — P. 2943–2950.
5. *Forney L. J.* Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king / Forney L.J., Zhou X., Brown C.J. // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 3. — P. 210–220.
6. *Hughes J. B.* Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity / Hughes J. B., Hellmann J. J., Ricketts T. H. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67, N 10. — P. 4399–4406.
7. *Janssen P. H.* Identifying the dominant bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes / Janssen P. H. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — Vol. 72, N 3. — P. 1719–1728.
8. *Kauffmann I. M.* DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts / Kauffmann I. M., Schmitt J., Schmid R. D. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — Vol. 64. — P. 665–670.
9. *LaMontagne M. G.* Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes / LaMontagne M. G., Schimel J. P., Holden P. A. // *Microb. Ecol.* — 2003. — N 46. — P. 216–227.
10. *Lipson D. A.* Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado rocky mountains / Lipson D. A., Schmidt S. K. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — Vol. 70, N 5. — P. 2867–2879.
11. *Marchesi J. R.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA / Marchesi J.R., Sato T., Weightman A. J. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1998. — Vol. 64, N 2. — P. 795–799.
12. *Miller D. N.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples / Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — Vol. 65, N 11. — P. 4715–4724.

13. *Moyer C. L.* A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature / Moyer C. L., Tiedje J. M., Dobbs F. C. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1996. — Vol. 62, N 7. — P. 2501–2507.
 14. *Nogales B.* Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil / Nogales B., Moore E. B., Llobet-Brossa E. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67, N 4. — P. 1874–1884.
 15. *Sambrook J.* Molecular cloning: a laboratory manual / Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. — NY.: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
 16. *Thompson J. D.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F. // *Nucleic Acids Research.* — 1997. — Vol. 24. — P. 4876–4882.
 17. *Torsvik V.* Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria / Torsvik V., Salte K., Sorheim R. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1990. — Vol. 56, N 3. — P. 776–781.
 18. *Weisburg W. G.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. [et al.] // *J. Bacteriol.* — 1991. — Vol. 173, N 2. — P. 697–703.
 19. *Yeates C.* Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification / Yeates C., Gillings M. R., Davison A. D. [et al.] // *Biological procedures online.* — 1998. — Vol. 1, N 1. — P. 40–47.
 20. *Zhou J.* Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface / Zhou J., Xia B., Huang H. [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — Vol. 70, N 3. — P. 1723–1734.
- Universal 16S rRNA primers BD1 for soil microbial community analysis**
- E. V. Korostik1, A. G. Pinaev1, G. A. Akhtemova1, E. E. Andronov1*
- ✿ **SUMMARY:** New universal 16S rRNA primers were constructed and tested. These primers allow identifying correct taxonomic position of bacterial isolates and were shown to be useful in microbial community studies. The primers enable to detect the vast majority of unique 16S rRNA gene sequences. In the study 160 restriction types were found in 16S rRNA clone library (190 clones).
- ✿ **KEY WORDS:** primers, 16S rRNA, soil, microbial community