

УДК 579.843+579.222

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ

Кацев А. М., Макемсон Дж.

Светящиеся бактерии интенсивно изучаются во всем мире, так как представляют собой не только интересный природный феномен, но и основу для большого количества биолюминесцентных методов анализа, которые широко используются на практике. Совсем недавно эти бактерии послужили основой для открытия нового явления общебиологического значения: quorum sensing, химического языка бактерий [1]. Этот генетический механизм, открытый впервые у морских светящихся бактерий *V. fischeri* и *V. harveyi*, позднее был обнаружен среди многих других видов грамотрицательных и грамположительных бактерий, как регулятор проявления многочисленных свойств, включая патогенные.

Несмотря на значительный прогресс в изучении физиологии, биохимии и генетики светящихся бактерий, многие вопросы их экологии и биологии люминесценции остаются не ясными. В этой связи, светящиеся бактерии Черного и Азовского морей являются практически не изученными объектами, которые в силу особенностей данных акваторий (низкая соленость, значительные перепады температур и др.) представляют большой интерес.

Целью работы было идентификация и изучение особенностей светящихся бактерий, выделяемых из Черного и Азовского морей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 23 штамма светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей на территории Крыма.

Выделение штаммов светящихся бактерий проводили из прибрежной морской фауны и образцов морской воды после концентрирования.

Для выращивания и очистки бактерий использовали среду, содержащую пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 30, K₂HPO₄*7H₂O – 15 г/л, (NH₄)₂HPO₄ – 0,5 г/л, MgSO₄ – 0,1 г/л, CaCO₃ – 0,2 г/л, глицерин – 3 мл/л, а также другие твердые и жидкие питательные среды, содержащие 1 – 3% NaCl. Температурный режим варьировали от 4 до 37⁰С и подбирали экспериментально. Анализ биолюминесценции проводили визуально в темной комнате после 5 – 15 мин адаптации глаз и количественно, с помощью биолюминометра БЛМ 8801 (СКТБ

«Наука», Красноярск). Бактерии хранили в анаэробных условиях (под вазелиновым маслом в столбиках агара), а также при -20°C с криоконсервантами.

Идентификацию выделенных штаммов светящихся бактерий проводили в соответствии с существующими рекомендациями по идентификации бактерий семейства *Vibrionaceae* и рекомендациями по быстрой идентификации фотобактерий [2, 3]. При этом оценивали: морфологические, тинкториальные свойства бактерий; характеристики их роста и билюминесценции при различных температурах; ферментацию сахаров; накопление клетками β -полиоксибутирата, а также ферментативные свойства.

Биохимическую идентификацию проводили путем определения типа кинетики люциферазной реакции. Для этого бактерии культивировали в колбах в режиме постоянного перемешивания в течение суток. После чего их разрушали ультразвуковой дезинтеграцией (UD-11 “Techpan”, Польша) и/или осмотическим лизисом, с последующим выделением белковых фракций, содержащих люциферазу. Для выделения и очистки фермента использовали осаждение сульфатом аммония и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефадексе (Reanal, Венгрия) [4, 5]. Кинетику люциферазной реакции изучали с использованием трех альдегидов: деканала (Aldrich, Germany), додеканала и тетрадеканала (Fluka, Switzerland). Для этого регистрировали изменения билюминесценции во времени (люминометр БЛМ-8801 с самописцем), в системе: 20 мкл препарата люциферазы (разведения подбирались экспериментально), 20 мкл 0,001 – 0,01% водно-спиртовой эмульсии альдегида. Иницирование реакции проводили быстрым введением (через дозатор А-2) 0,5 мл 10^{-5} М фотовосстановленного ФМНН₂, содержащего 10^{-3} М ЭДТА. По полученным графическим зависимостям определяли время полужатухания билюминесценции ($\tau_{1/2}$), которое использовали для сравнения кинетики люциферазных реакций, выделенных штаммов [6].

Фенотипирование выделенных штаммов проводили с использованием системы BIOLOG (Biolog, USA): планшеты Biolog GN2, идентификационная система Microstation ID system, программа MicroLog System [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первые опыты по выделению светящихся бактерий из воды Черного моря показали, что свободноживущих форм содержится крайне мало. Как в летнее, так и в зимнее время, не удалось получить ни одного светящегося изолята. Последующий анализ некоторых обитателей прибрежной зоны Черного моря (рыбы, мидии и тп), а также посевы с кожных покровов Черноморского катрана дали возможность выделить сапрофитные формы светящиеся бактерии, а затем и получить их в чистом виде. Всего было выделено 14 изолятов, таблица 1.

При проведении исследований на Азовском море в летний период (г. Щелкино, 2001 г), когда вода в море прогревалась до $30 - 35^{\circ}\text{C}$, светящиеся бактерии обнаруживались повсеместно, как в виде свободноживущих форм в воде, так и в виде сапрофитных. Всего было получено 9 изолятов.

Для идентификации выделенных штаммов светящихся бактерий, прежде всего, оценивали их температурные оптимумы роста, способность расти при различных

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ,

концентрациях хлорида натрия, наличие желтого пигмента (характерного только для *V. fischeri* и *V. logei*). На следующем этапе изучали ферментацию бактериями различных сахаров с образованием кислот (ряды Гиса), оксидазную и каталазную активности. Эти исследования выявили аномально высокие температуры роста (37°C и выше) и биолюминесценции (35 – 37°C) для большинства бактерий, выделенных из Азовского моря. По наличию пигмента, оксидазной активности и оптимальным температурам роста, все выделенные штаммы были разделены на рода *Vibrio* (14 изолятов) и *Photobacterium* (9 изолятов) [4].

Таблица 1.
Светящиеся бактерии, выделенные на территории Крыма.

Светящиеся бактерии	<i>V. fischeri</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>P. phosphoreum</i>	<i>P. leiognathi</i>	<i>Vibrio sp.</i>
Количество выделенных штаммов:						
Черное море (14)						
• Вода	0	0	0	0	0	0
• Фауна	4	2	3	3	0	2
Азовское море (9)						
• Вода	0	0	0	0	3	1
• Фауна	0	0	0	0	3	2
Температуры роста и люминесценции, °C	20 – 30	15 – 20	25 – 30	18 – 25	28 – 35	28 – 35
Тип ферментативной кинетики с додеканалем	Быстрый	Средний	Медленный	Средний	Быстрый	Медленный

Другой подход заключался в изучении кинетики люциферазной реакции с различными альдегидами. Люцифераза – фермент, катализирующий реакцию биолюминесценции, в ходе которой, восстановленный флавиномононуклеотид и альдегидов (с длиной цепи 10 – 16 углеродных атомов) окисляются кислородом. Многочисленные исследования с использованием додеканала показали, что для рода *Photobacterium* и вида *Vibrio fischeri* характерен быстрый тип люциферазной кинетики с константами более 0,6 с⁻¹, а для остальных светящихся представителей рода *Vibrio* – медленный, с константами менее 0,05 с⁻¹ [7].

Изучение ферментативной кинетики выделенных штаммов проводилось с использованием трех разных альдегидов тетрадеканала, додеканала и деканала. Реакции с тетрадеканалем позволила отличить вид *P. phosphoreum* от других видов этого рода и вида *V. fischeri* (для которых характерен быстрый тип люциферазной кинетики). Реакция с додеканалем позволила разделить штаммы с быстрыми и медленными кинетическими характеристиками и выделить особую группу с промежуточными значениями $\tau_{1/2}$, в которую вошли все Черноморские штаммы *P. Phosphoreum*. Обычно не используемая в систематике реакция люциферазы с

деканалем в нашем случае позволила отделить вид *Photobacterium leiognathi* от всех других видов [4].

Совмещение этих двух подходов дало возможность провести предварительное определение видовой принадлежности большинства выделенных штаммов, представленное в таблице 1.

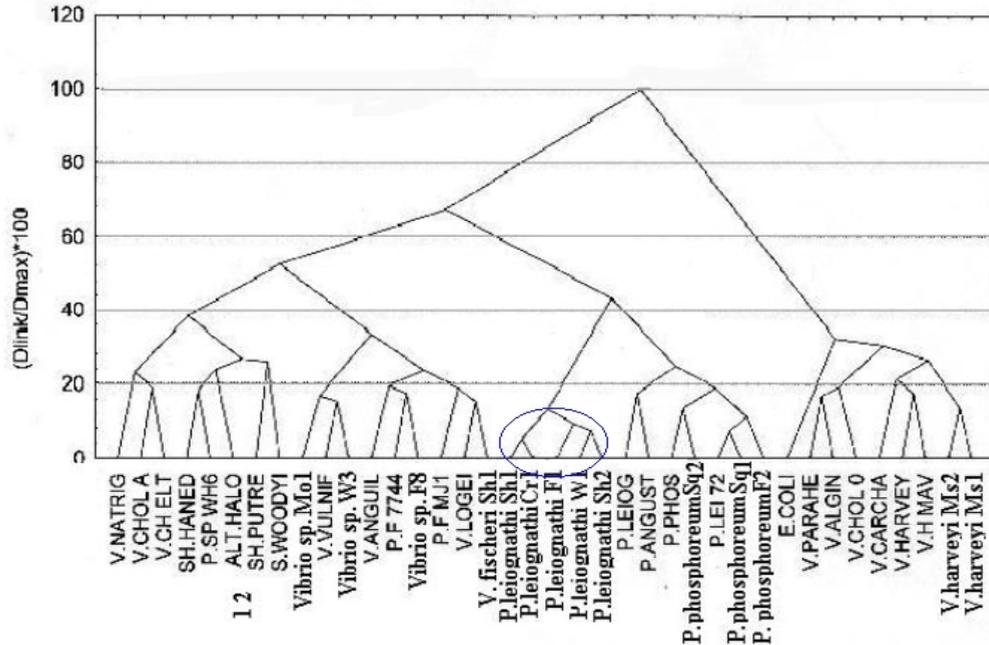


Рис. 1. Кластерный анализ фенотипов выделенных штаммов светящихся бактерий в сравнении с существующими кластерами.

Для окончательного установления вида было проведено фенотипирование 14 выделенных штаммов с использованием планшетов Biolog GN2 (США), включающих в себя 96 субстратов-источников углерода и предназначенных для идентификации грамотрицательных бактерий. Полученные результаты обрабатывались с помощью программы MicroLog System путем сравнения с базой данных из 500 видов грамотрицательных бактерий и последующего кластерного анализа результатов, рис.1 (на рисунке выделенные штаммы, обозначены, шрифтом Times New Roman, без сокращений).

Проведенные исследования в целом подтвердили предварительную идентификацию выделенных светящихся бактерий и выявили группу, достоверно отличающуюся от всех известных видов. В неё вошли пять штаммов *P.leiognathi*, выделенных из Азовского моря (вода, моллюски, рыбы) и обладающих аномально высокими температурными оптимумами. Остальные штаммы с быстрой кинетикой люциферазной реакции имели фенотип сходный с известными видами *P. leiognathi*,

P. phosphoreum и *Vibrio fischeri*, а штаммы с медленной кинетикой были фенотипически похожи на виды *V. harveyi* and *V. vulnificus*.

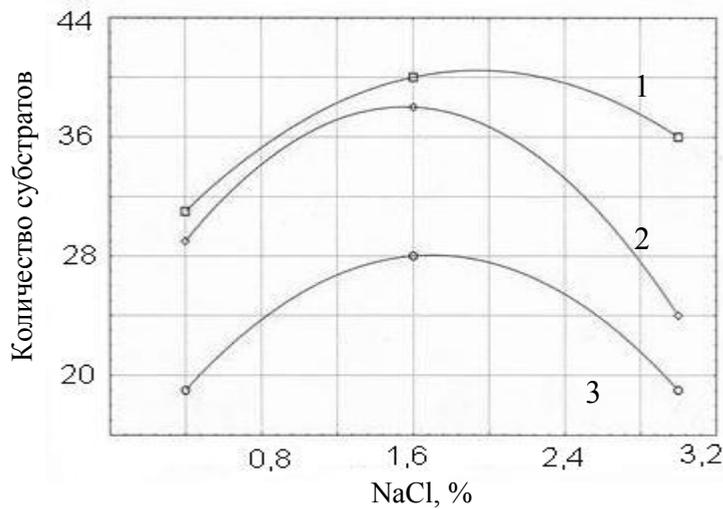


Рис. 2. Количество субстратов Biolog, употребляемых бактериям при различном содержании NaCl в среде. 1 – *Vibrio. sp* W3; 2 – *Vibrio. sp* Mo1; 3 – *Vibrio. sp* F8.

Сравнение роста и потребления субстратов (Biolog) выделенными штаммами при различном содержании соли в среде показало, что максимальные значения этих характеристик наблюдались при пониженной солености (1,5 – 2%). Количество потребляемых субстратов возрастало на 8 – 10 единиц, рис. 2. Для максимальной люминесценции бактериям необходима концентрация NaCl 2,5 – 3%.

ВЫВОДЫ

1. Из Черного и Азовского морей выделены и идентифицированы 23 штамма светящихся бактерий. Из них: из Черного моря – 14 штаммов, из Азовского – 9 штаммов.

2. С использованием планшетов Biolog GN и кластерного анализа установлено, что группа бактерий, идентифицированная, как *P. leiognathi*, достоверно отличается от всех известных кластеров грамтрицательных бактерий. Эти же бактерии обладали высокими температурными оптимумами, не характерными для светящихся бактерий.

3. Обнаружено, что метаболическая активность светящихся бактерий (рост и потребление субстратов) выше при низких концентрациях соли (1,5-2,0%), в то время как биолюминесценция максимальна при 2,5 – 3,0% хлорида натрия.

Список литературы

1. Michiko E. Taga and Bonnie L. Bassler. Chemical communication among bacteria // PNAS. – 2003. - V. 100, suppl. 2. – P. 14549–14554.
2. Определитель бактерий Берджи. Т. 1 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
3. Светящиеся бактерии / Гительзон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. – Новосибирск: Наука, 1984. – 279 с.
4. Малыгина В. Ю., Кацев А. М. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей // Экология моря. – 2003. – Т. В. 64. – С. 18 – 23.
5. Кацев А. М. Некоторые характеристики Черноморских светящихся бактерий и их прикладное значение // Прикладн биохимия и микробиология. – 2002. – №2 – С. 189-192.
6. Воробьева Т. И., Заворуев В. В., Межевикин В. В., Примакова Г. А. Кинетические свойства люцифераз и таксономия светящихся бактерий // Микробиология. – 1982. – Т. 51, вып.3. – С. 420-423.
7. Makemson, J. C., N. R. Fulayfil, W. Landry, L. M. V. Ert, C. F. Wimpee, E. A. Widder, and J. F. Case. *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – V.47. – P. 1034 – 1039.

Поступила в редакцию 13.12.2006 г.