

УДК 579.222:579.66:579.843

DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-4-120-128

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ ЧЁРНОГО МОРЯ

Кочетова А. А.¹, Кацев А. М.²

¹*Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С. И. Георгиевского
Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего
образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь,
Россия*

²*Институт биохимических технологий, экологии и фармации Федерального
государственного автономного образовательного учреждения высшего образования
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Россия
E-mail: maleksovna@list.ru*

Выделены два новых штамма биоллюминесцентных бактерий из образцов воды Чёрного моря, отобранных вблизи города Феодосия и пгт Гурзуф. Проведено определение их родовой принадлежности. Выделение бактерий проводилось стандартными методами с использованием микропористых мембран для концентрирования морской воды. Установлено, что оптимальными условиями их роста и биоллюминесценции являются температура 25 °С и концентрация NaCl в питательной среде 2 ‰. Оба штамма ферментировали маннит, глюкозу и галактозу и обладали быстрым типом люциферазной кинетики. Исходя из полученных данных, выделенные бактерии были отнесены к роду *Aliivibrio* и, предположительно, принадлежат одному виду. Интенсивная биоллюминесценция и высокая скорость роста делает новые штаммы морских бактерий перспективными тест-объектами для биотестирования.

Ключевые слова: биоллюминесценция, бактерии, люцифераза, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Биоллюминесценция – свойство живых организмов излучать свет в видимой области спектра в результате биохимической реакции окисления люциферина, катализируемой ферментом люциферазой. Такое явление наблюдается у представителей многих таксономических групп: водоросли (динофлагелляты), грибы (мицеларный хлорофос, панеллюс вяжущий) насекомые (светлячки, люминесцентные органы личинок и самок жука Фриксотрикс) и т.п. Данное исследование направлено на изучение морских биоллюминесцентных микроорганизмов, к которым относятся бактерии рода *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio* и *Shewanella* [1].

Люминесцентные (светящиеся) бактерии в качестве люциферина используют восстановленный флавиномононуклеотид (FMNH₂), который является кофактором многих ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях.

Фермент люцифераза состоит из двух субъединиц (α и β), кодируемых генами luxA и luxB, соответственно [2].

В настоящее время светящиеся микроорганизмы активно используются для оценки токсичности воды, биомониторинга окружающей среды, разработки лекарственных средств с антибактериальной активностью (в том числе антибиотиков) [3, 4]. Этот метод достаточно удобен, так как любое воздействие со стороны окружающей среды влияет на бактериальный метаболизм, в том числе на биолюминесценцию, интенсивность которой можно зарегистрировать и, тем самым, оценить действие того или иного фактора.

Целью работы является изучение биоразнообразия биолюминесцентных бактерий Чёрного моря и их особенностей для последующего использования в аналитических целях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В течение лета и осени 2024 года исследовались пробы морской воды, отобранные в разных акваториях прибрежной зоны Чёрного моря, в районе города Феодосия и пгт Гурзуф. Для концентрирования морских бактерий 40 мл пробы фильтровали через капроновые микропористые мембраны с диаметром пор 0,2 мкм (р/к «Хийу Калур»), которые затем помещали на поверхность питательного агара, содержащего 3 % хлорида натрия.

Выделение и культивирование светящихся бактерий проводили стандартными микробиологическими методами с использованием жидкой и агаризованной питательных сред следующего состава: жидкая питательная среда: пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 1,5 г/л, NaCl – 30 г/л, мясной экстракт В – 1,5 г/л; плотная питательная среда: пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 1,5 г/л, NaCl – 30 г/л, агар – 15 г/л, НМ пептон В # – 1,5 г/л [5].

Концентрацию бактерий в жидкой среде оценивали по оптической плотности ($\lambda=630$ нм) с помощью планшетного анализатора Mindray MR-96 A (Китай).

Свечение морских бактерий анализировали визуально в темном помещении после 5–10 минут адаптации глаз. Интенсивность биолюминесценции количественно измеряли в условных единицах (мВ), с использованием биолюминометра БЛМ 8801 – СКТБ «Наука» (Россия) и портативного люминометра LDNova Primus («Цифровые сенсорные технологии», Россия).

Для идентификации выделенных бактерий изучали их ферментативную активность в отношении следующих источников углерода: галактозы, сахарозы, лактозы, мальтозы и маннита, которые часто используются в систематике бактерий семейства Vibrionaceae. Диагностические среды Гисса готовили стандартным способом с конечной концентрацией NaCl 3 %. Результаты оценивали как положительные (+) по изменению окраски питательной среды с зеленой на желтую через 24 часа культивирования бактерий при 25 °C [6].

Для видовой идентификации выделенных бактерий определяли кинетические характеристики фермента люциферазы, которые также используются в систематике светящихся бактерий [1]. Выделение фермента проводили из биомассы бактерий, которую выращивали на жидкой питательной среде объемом 25 мл в течение 24

часов при температуре 25 °С и периодическом перемешивании. Полученную суспензию бактерий центрифугировали в течение 35 минут при 6000 об/мин с применением центрифуги ОПН-8 (Россия). После удаления супернатанта бактериальную биомассу лизировали добавлением 2 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера pH=7,3 с последующим трехкратным замораживанием-оттаиванием. Разрушенные клетки отделяли от белкового раствора центрифугированием в течение 45 минут при 6000 об/мин с применением центрифуги (Microspin-12, Biosan, Латвия). Белковую фракцию концентрировали добавлением сульфатом аммония до 80 % от насыщения.

Для изучения кинетики люциферазной реакции осажденный белок отделяли центрифугированием и растворяли в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH=7,3. Определение кинетического типа люцифераз проводили путем измерения интенсивности биолюминесценции во времени с помощью хемилюминометра Lum-100 (ООО «ДИСофт», Россия). В измерительную кювету вводили 200 мкл натрий-фосфатного буфера (pH=7,3), 20 мкл 0,1 %-й суспензии додеканала в воде, и 30–50 мкл полученного ферментного препарата (Гурзуф и Феодосия соответственно) с экспериментально подобранной концентрацией. Биолюминесценцию инициировали введением 200 мкл $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л фотовосстановленного FMNH₂ (Sigma-Aldrich) (содержащего $1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л Трилона Б) [7]. Полученные зависимости биолюминесценции от времени обрабатывали математически с целью определения константы скорости спада биолюминесценции $k = \ln(I_1/I_2)/(t_2 - t_1)$ и время полуспада $t_{1/2} = \ln 2/k$, где k – константа скорости спада (затухания) биолюминесценции; I_1 и I_2 – интенсивности биолюминесценции в моменты времени t_1 и t_2 . На этом этапе для обработки полученных данных использовали программу MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения светящихся бактерий использовали образцы морской воды, отобранные в районе городов Феодосия и Гурзуф. Бактерии концентрировали мембранной фильтрацией и выдерживали на агаризованной питательной среде 9–12 часов при комнатной температуре. При визуальной оценке биолюминесценции были обнаружены светящиеся колонии на месте фильтра и его отпечатка (Рис. 1 А).

Светящиеся колонии (зоны на фильтре) отбирали стерильной микробиологической петлей и пересевали на жидкую питательную среду, содержащую 3 % NaCl. При визуальном выявлении биолюминесценции в течение 24 часов, проводили дальнейшую очистку бактериальной культуры стандартными микробиологическими методами [5]. Очищенная бактериальная культура Гурзуф (Г) характеризовалась желтоватыми колониями округлой формы (Рис. 1 Б). Штамм Феодосия (Ф) также образовывал бактериальные колонии округлой формы, но более белые по цвету. Через 3–5 суток роста на плотной питательной среде разница в цвете колоний выделенных штаммов усиливалась. Оба полученных изолята при визуальной оценке обладали сходной по интенсивности биолюминесценцией (Рис. 1 В).

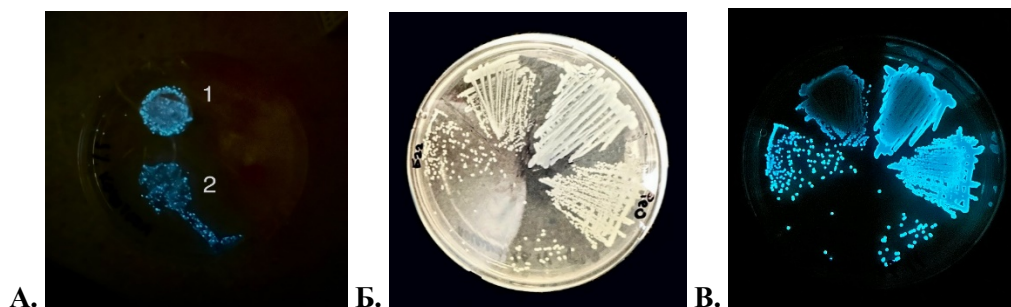


Рис. 1. Биолуминесценция и рост выделенных морских бактерий. А – на плотной питательной среде после концентрирования морской воды мембранной фильтрацией (1 – бактерии на фильтре, 2 – бактерии на отпечатке фильтра). Чистые культуры выделенных люминесцентных бактерий на плотной питательной среде. Б – при дневном свете, В – в темноте.

Первичное изучение роста и биолуминесценции выделенных бактерий проводили при температурах 6–35 °С. Отмечено, что максимальные значения роста и свечения штаммов наблюдались при 25 °С и значительно снижались при более высокой и более низкой температурах, Таблица 1. Для бактерий, выделенных в районе Гурзуфа, при температурах выше 30 °С биолуминесценции не наблюдалось. Бактерии, выделенные в районе Феодосии, отличались более высокими температурными характеристиками и обладали способностью к биолуминесценции при 35 °С.

Таблица 1
Оптическая плотность и биолуминесценция бактерий при разных температурах

Штамм светящихся бактерий	Оптическая плотность при 630 нм				
	Биолуминесценция, мВ				
	6°С	10°С	25°С	30°С	35°С
Штамм Г (Гурзуф)	0,335 4	0,132 13	0,930 20	0,421 0	0,121 0
Штамм Ф (Феодосия)	0,148 25	0,44 48	1,019 140	0,879 16	0,995 4

При изучении способности бактерий ферментировать различные источники углерода было установлено, что исследуемые штаммы обладают одинаковыми пищевыми потребностями и способны утилизировать маннит, глюкозу и галактозу с образованием кислот (среды Гисса) (Рис. 2). В присутствии сахарозы и лактозы

ферментации не происходило, цвет среды не менялся и при этом сохранялась бактериальная люминесценция.

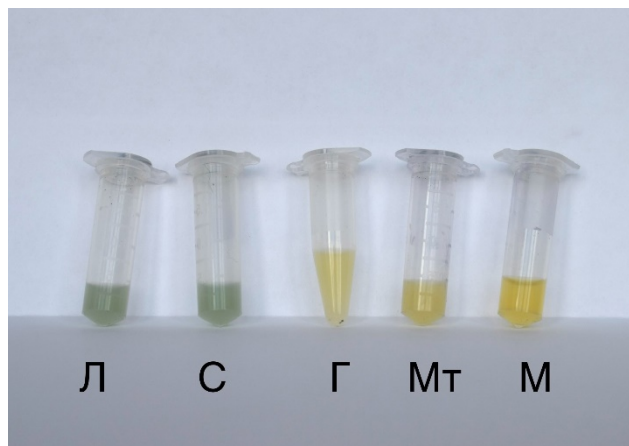


Рис. 2. Ферментация различных источников углерода выделенными штаммами светящихся бактерий (ряды Гисса). Л – лактоза, С – сахароза, Г – D-галактоза, Мт – D-маннит, М- мальтоза.

Результаты анализа способности роста и биолюминесценции бактерий при различных концентрациях хлорида натрия также показали сходные результаты, Таблица 2. Бактерии обладали способностью расти и светиться в широком интервале концентраций NaCl от 1 % до 5 %. Максимальные характеристики наблюдались при 2 % NaCl. В средах без хлорида натрия роста и биолюминесценции бактерий не наблюдалось.

Таблица 2
Биолюминесценция выделенных штаммов морских бактерий при различных концентрациях NaCl

Концентрация NaCl (%)	Биолюминесценция бактерий, мВ	
	Гурзуф	Феодосия
0	0	0
1	130,0±58,6	147,5±32,1
2	200±100,0	207,5±36,1
3	147,5±81,9	170,0±20,0
5	42,5±5,8	61,25±2,9

Для идентификации штаммов полученных бактерий также определяли тип кинетики люциферазной реакции, как описано в разделе материалы и методы. При введении фотовосстановленного ФМНН₂ наблюдался всплеск свечения с последующим спадом во времени (Рис. 3). Расчеты показали, что выделенные штаммы светящихся бактерий характеризуются близкими значениями констант скорости спада и времени полуспада биолюминесценции.

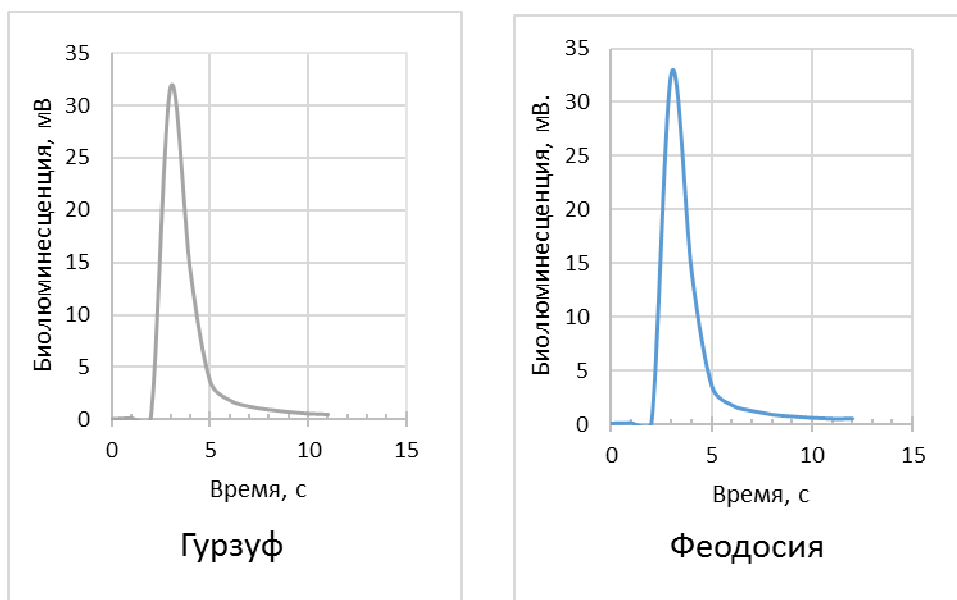


Рис. 3. Кинетика люциферазной реакции выделенных штаммов морских бактерий.

Исходя из имеющихся литературных данных, можно заключить, что выделенные штаммы люминесцентных бактерий относятся к роду *Aliivibrio*, для которого характерно употребление D-маннита и D-галактозы (для большинства исследованных видов). Отсутствие желтого пигмента говорит о том, что штаммы не являются представителями видов *Aliivibrio fischeri* и *Aliivibrio logei*, хотя и обладают быстрым типом ферментативной кинетики. Необычным является обнаружение таких бактерий в морской воде в виде свободноживущих форм, для которых более характерен медленный тип люциферазной реакции [1]. Проведенные ранее исследования показали, что в морской воде Черного моря в основном обнаруживаются люминесцентные бактерии, относящиеся к виду *Vibrio harveyi* (clade), Таблица 3.

Можно также предположить, что данный факт связан с какими-то комплексными экологическими изменениями акваторий мирового океана. В качестве аргумента отметим, что недавно у берегов Канарского архипелага Тенерифе впервые в истории был обнаружен глубоководный вид *Melanocetus*

johnsonii (Черный удильщик), представители которого являются хозяевами для люминесцентных бактерий-симбионтов (чаще всего *A. fischeri*) [8].

Таблица 3
Характеристика штаммов Гурзуф и Феодосия в сравнении с выделенными ранее морскими бактериями Черного моря

Вид	Год и источник выделения	Глюкоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Галактоза	Лактоза	Пигмент	Кинетика люциферазы, (к, с ⁻¹)
<i>Vibrio harveyi</i> clade	2007–2008, гидробионты	+	+	+	+	-	-	-	Медленная (0,041)
	2009, 2015, 2016, морская вода	+	+	+	-	-	-	-	Медленная (0,043)
	2017, морская вода	+	+	+	+	+		-	Медленная (0,057)
	2018 (4 штамма), морская вода	+	+	+	-	+		-	Медленная (0,037)
<i>Photobacterium</i>	2007–2008, гидробионты	+	-	-	-	-	-	-	Быстрая (0,36)
<i>Aliivibrio fischeri</i>	2007–2008, гидробионты	+	-	-	+	-		Ж	Быстрая (0,40)
Гурзуф	2024, морская вода	+	+	+	-	+	-	-	Быстрая (0,48)
Феодосия	2024, морская вода	+	+	+	-	+	-	-	Быстрая (0,55)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что выделенные штаммы морских бактерий обладают близкими характеристиками роста и биолюминесценции при различных температурах и концентрациях NaCl, а также имеют одинаковую сахаролитическую активность. Сделан вывод о принадлежности штаммов к одному виду рода *Aliivibrio*. Яркая биолюминесценция и высокая скорость роста выделенных бактерий дают основание предполагать, что они найдут применение в качестве тест-объектов при биотестировании.

Список литературы

1. Дерябин Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М. : Наука, 2009. – 248 с.

2. Завильгельский Г. Б. Механизмы и происхождение бактериальной билюминесценции / Г. Б. Завильгельский, Р. С. Шакулова. // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52, №6 – С. 935–947.
3. Ажогина Т. Н. Оценка токсичности почв Ростовской области с помощью билюминесцентных тестов / Т. Н. Ажогина, А. А. Аль-Раммахи, Н. В. Гненная // Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции : Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием, Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 года. – Ростов-на-Дону – Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – С. 107–108.
4. Османова С. Я. Сравнение метода диффузии в агар и билюминесцентного анализа для определения антимикробной активности антибиотиков / С. Я. Османова, С. Л. Сафронюк, А. х. Б. Кияев, А. М. Кацев // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2024. – Т. 23, № 1. – С. 248–254.
5. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер – М. : Медицина, 1973. – 73 с.
6. Семанин А. Г. Изучение сахаролитических свойств бактерий, выделенных из различных открытых водоёмов РФ / Семанин А. Г. // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – 2017. – С. 261–264.
7. Кацев А. М. Ферментативная активность светящихся бактерий Чёрного и Азовского морей и их антиоксидантная защита / А. М. Кацев // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. – 2014. – Т. 27 (66), № 3. – С. 184–193.
8. Bittel J. Scientists capture extremely rare footage of a black seadevil / Bittel J. // National Geographic, 2025. – URL: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/black-seadevil-anglerfish-video-canary-islands> (дата обращения 30.04.2025).

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NEW STRAINS OF BLACK SEA BACTERIA

Kochetova A. A.¹, Katsev A. M.²

¹The Labour Red Banner Order Medical Institute named after S. I. Georgievskiy of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "V. I. Vernadsky Crimean Federal University", Simferopol, Russia

²Institute of Biochemical Technologies, Ecology and Pharmacy of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "V. I. Vernadsky Crimean Federal University", Simferopol, Russia

E-mail: maleksovna@list.ru

This paper describes the isolation of two new strains of bioluminescent bacteria from the Black Sea from the coasts of Feodosia and Gurzuf, as well as the determination of their generic affiliation.

The strains were isolated by standard methods using microporous membranes. They were cultured in liquid nutrient environment at different temperatures. The study of the growth and bioluminescence of the isolated bacteria was carried out at temperatures of 6–35 °C. It was noted that the maximum values of growth and luminescence of the strains were observed at 25 °C and significantly decreased at higher and lower temperatures. No bioluminescence was observed for Gurzuf bacteria at temperatures above 30 °C. The bacteria isolated in the Feodosiya region had higher temperature characteristics and were capable of bioluminescence at 35 °C.

During studying the ability of bacteria to ferment various carbon sources, it was found that the strains have the same nutritional needs and are able to utilize mannitol, glucose, and galactose to form acids. In the presence of sucrose and lactose, fermentation did not occur, the color of the environment did not change, and bacterial luminescence remained.

The results of the analysis of bacterial growth and bioluminescence at different concentrations of sodium chloride showed similar results. The bacteria had the ability to grow and glow in the range of NaCl concentrations from 1 % to 5 %. The maximum characteristics were observed at 2 % NaCl. Bacterial growth and bioluminescence were not observed in media without sodium chloride.

During biochemical analysis, both strains demonstrated a fast type of luciferase kinetics. With the introduction of photo-reduced FMN, a burst of luminescence was observed, followed by a decrease in time. Calculations showed that the isolated strains of luminous bacteria are characterized by close values of the constants of the rate of decay and the half-life of bioluminescence.

Presumably, these strains belong to the genus *Aliivibrio* and, given the similarities in the properties they exhibit, they probably belong to the same species. The use of bioluminescent bacteria as an object for testing is a promising direction in research.

In conclusion, the strains showed a similar tendency to change optical density and luminescence at different NaCl concentrations and temperatures, and the same saccharolytic activity. These indicators serve as a reason for the assumption that both strains belong to the same species. The bright bioluminescence and high growth rate of the isolated strains suggest that they will find application as test strains in biotesting.

Keywords: bioluminescence, bacteria, luciferase, the Black Sea.

References

1. Deryabin D. G. *Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects*, 248 p. (Nauka, Moscow, 2009).
2. Zavigelsky G. B. Mechanisms and origin of bacterial bioluminescence, *Molecular Biology*, **52**, **6**, 935 (2018).
3. Azhogina T. N. Assessment of soil toxicity in the Rostov region using bioluminescence tests, *Genetics is the fundamental basis of innovations in medicine and breeding: Proceedings of the VIII Scientific and Practical conference with international participation, Rostov-on-Don, September 26-29, 2019*. 107, (2019).
4. Osmanova S. Ya. Comparison of the method of diffusion into agar and bioluminescent analysis for determining the antimicrobial activity of antibiotics, *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, **23**, **1**, 248 (2024).
5. Birger M. O. *Handbook of microbiological and virological research methods*, 73 p. (Medicine, Moscow, 1973).
6. Semanin A. G. Study of the saccharolytic properties of bacteria isolated from various open reservoirs of the Russian Federation, *Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions*, 261 (2017).
7. Katsev A. M. Enzymatic activity of luminous bacteria of the Black and Azov Seas and their antioxidant protection, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Tauride National University*, **27** (**66**), **3**, 184 (2014).
8. Bittel J., Scientists capture extremely rare footage of a black seadevil, *National Geographic* (2025). Available aturl: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/black-seadevil-anglerfish-video-canary-islands> (accessed 30.04.2025).