УДК 573.6:579.22:579.26:579.843

НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ АЗОВСКОГО МОРЯ

А.М. Кацев

Кафедра общей химии (зав. кафедрой– доц. А.М. Кацев), Государственное у чреждение «Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского», г. Симферополь, бул. Ленина 5/7.

NEW THERMOPHILIC LUMINESCENT BACTERIAEXTRACTED FROM THE AZOV SEA

A. M. Katsev

SUMMARY

We extracted luminous bacteria from the Crimean water area of the Azov Seato find new perspective test-strains for bioluminescent analysis. We have found six strains possessing bright bioluminescence; they areidentifiedas*Photobacterium leiognathi*. Luciferase kinetics type as well as different carbon-containing substrates fermentationand temperature optimum intervals of growth and bioluminescence have been studied for primary identification. We have phenotyped the extracted strains using theBiologsystemfor identificationof microorganisms. We have established that the strains form a separate cluster close to *P. leiognathi*yet different from all the known species. Based on the obtained results, we can suggest that either the studied strains belong to new bacterial species or *P. leiognathi* speciespossessa widervariability. High thermophilicity and a low level of halophilic properties of these bacteria make them perspective test objects for biotesting under physiological conditions.

НОВІ ТЕРМОФІЛЬНІ ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ БАКТЕРІЇ, ВИДІЛЕНІ З АЗОВСЬКОГО МОРЯ

А.М. Кацев

РЕЗЮМЕ

З метою пошуку нових перспективних тест-штамів для біолюмінесцентного аналізу проведено виділення світних бактерій в акваторії Азовського моря на території Криму. Виділено 6 штамів, що володіють яскравою біолюмінесценцією, які були ідентифіковані, як *Photobacterium leiognathi*. Для первинної ідентифікації вивчали тип люциферазної кінетики, ферментацію різних джерел вуглецю, температурні інтервали зростання і біолюмінесценції. Додатково проводили фенотипування бактерій за допомогою системи ідентифікації мікроорганізмів Biolog. При цьому було виявлено, що усі виділені штами утворюють окремий кластер, близький до *P. leiognathi*, але, проте, що відрізняється від усіх відомих видів. Отримані результати можуть свідчити про приналежність бактерій до нового виду, або про ширшу варіабельність властивостей *P. leiognathi*. Висока термофільність і знижена галофільність виділених штамів робить їх перспективними тест-об'єктами для біотестування у фізіологічних умовах.

Ключевые слова: люминесцентные бактерии, фенотипирование, биотестирование.

Бактериальный биолюминесцентный анализ широко используется во всем мире для быстрой оценки биотоксичности,как водных сред, так и гетерогенных систем, содержащих твердые частицы[1]. В большинстве коммерчески доступных тест-систем, таких какMicrotox», «LUMIStox» «BioTox», используется один штамм светящихся бактерий *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Однако эти тесты обладают неодинаковой чувствительностью к токсическим веществам различных классов и их методику невозможно адаптировать к конкретным образцам, что ограничивает возможности биотестирования [2]. В результате этого в международный стандарт ISO(ISO №11348) вошли две методики, которые включают в себя использование как лиофильно высушенной культуры светящихся бактерий *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (аналогично «Microtox»), так и бактерий, культивируемых в лабораторных условиях. Практическим воплощением дальнейшего совершенствования методик биолюминесцентного тестирования и поисков более чувствительных тест-штаммов, явился еще одни коммерческий тест «Checklight», основой которого стали светящиеся бактерии другого вида *Photobacterium leiognathi* [3].

В данной работе проведена оценка фенотипических особенностей штаммов *P. leiognathi*,выделенных из Азовского моря на территории Крыма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение штаммов светящихся бактерий. Морская вода для исследований отбиралась в прибрежных зонах азовского моря, в районе городов Щелкино иКерчи в летнее время (июль-август). Образцы транспортировали в лабораторию для дальнейших исследований, или проводили предварительные эксперименты непосредственно в полевых условиях. 10–50 мл морской воды концентрировали

методом мембранной фильтрациичерез бактериальный фильтр с размером пор 0,2 мкм (Хийу калур, эстония). Фильтр помещали на чашку Петри с твердой питательной средой Himedia laboratories pvt. Limited (Индия), в которую дополнительно вводили NaCl до концентрации 3%, и инкубировали при температуре 20–25 °С. Через 5 часов анализировали биолюминесценцию образцов визуально в темном помещении, после адаптации глаз в течение 10 – 20 минут. При обнаружении свечения, отбирали светящиеся зоны стерильной микробиологической петлей и производили выделение и очистку бактерий по стандартным методикам.

Для выделения светящихся бактерий также использовали другие объекты, полученные из морской среды (моллюски, рыба, водоросли и т.п.). Принцип работы со всеми образцами был приблизительно одинаков. Свежевыловленный образец помещали в контейнер с небольшим количеством 3% хлорида натрия. Инкубацию проводили при температуре 20–25 °С, в течение 12 – 24 ч. Через 5 часов после начала инкубации периодически анализировали объекты в темном помещении после адаптации глаз, с целью обнаружения свечения. При обнаружении биолюминесценции, соответствующую зону отбирали стерильной микробиологической петлей и проводили выделение и очистку бактерий.

Идентификация светящихся бактерий. Идентификацию выделенных штаммов светящихся бактерий проводили в соответствии с существующими рекомендациями по идентификации бактерий семейства *Vibrionacea* и рекомендациями по быстрой идентификации фотобактерий [4]. При этом оценивали: морфологические и тинкториальные свойства бактерий; характеристики их роста и биолюминесценции при различных температурах; ферментацию сахаров; накопление клетками в-полиоксибутирата.

Изучение люциферазной кинетики проводили с использованием трёх альдегидов: деканаль (Aldrich, Germany), додеканаль и тетрадеканаль (Fluka, Switzerland) и выделенных из биомассы бактерий ферментных препаратов. Получение препаратов люциферазы для анализа проводили по методике [5]. Изменения биолюминесценции во времени регистрировали с помощью люминометра БЛМ-8801 (Россия)с самописцем, в системе: 20 мкл препарата люциферазы (разведения подбирались экспериментально), 20 мкл 0,001 – 0,01% эмульсии альдегида, после инициирования реакции 0,5 мл 10^{-5} моль/л фотовосстановленного флавинмононуклеотида ($ФМНН_2$), содержащего 10^{-3} моль/л Трилона Б. Восстановление ФМН проводили в стеклянном змеевике, который освещался лампой дневного света мощностью 25 Ватт. Критерием восстановления было исчезновение желтой окраски ФМН. Дозирование восстановленного $ФМНН_2$ осуществляли с помощью дозатора А-2 (Украина) через иглу непосредственно в кювету люминометра.

Дополнительное фенотипирование бактерий проводили с использованием 96-луночных планшетов Biolog GN Microplate (Biolog, USA). Системаидентификации микроорганизмов Biologвключала в себя определение способности микроорганизмов окислять 95 органических субстратов, перечень которых выбирался исходя из свойств тестируемых микроорганизмов.Результаты теста Biolog обрабатывали с использованием кластерного анализа с помощью программы Statistica (StatSoft, Tulsa, Okla). Кластеры формировались на основании следующих признаков: окраска по Граму, морфология, температуры роста (4, 25, 37 и 42 °С), оксидазная и каталазная активности, тип люциферазной кинетики, результаты окисления субстратов Biolog. Кластеры анализировали методом Варда (Ward's method), определяя Эвклидовы расстояния. Результаты компьютерной обработки представляли, как вертикальные древовидные диаграммы, где по оси Y откладывали Эвклидовы расстояния, а по оси X – сравниваемые штаммы бактерий. Этот этап работы проводился на кафедре микробиологии Университета Флориды в лаборатории профессора Дж. Макемсона (Florida International University, Miami).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено выделение светящихся бактерий в акватории Азовского моря на территории Крыма. Данная акватория обладает рядом отличительных черт, которые имеют отношение к объекту исследования. Азовское море является самым мелким в мире морем и поэтому обладает низкой тепловой инерцией, замерзая в зимний период и нагреваясь до 35°С и выше, в летний период. Перепады температур при этом могут достигать 40 и более градусов. Соленость Азовского моря меньше, чем Черного, и может быть в пределах 10 - 13 промилей (приблизительно в 3 раза ниже солености океана). Высокие значения температуры приводят к высокой биологической активности моря, по которой оно занимает одно из лидирующих мест в мире.

При проведении микробиологических исследований на Азовском море в летний период, вода в прибрежной зоне прогревалась до 30–36°С. При этом, светящиеся бактерии присутствовали повсеместно и выделялись практически из всех используемых источников, включая воду. В ходе работы было выделено 6 штаммов светящихся бактерий, из которых 3 – непосредственно из воды (маркировка W), а остальные из таких представителей фауныАзовского моря, как краб (Cr), креветка (Sh) и рыба (F). Все полученные изоляты были термофильны, а некоторые продолжали расти при температуре 40°С и люминесцировали до температуры 36 °С, что можно считать нетипичным признаком для этой группы бактерий [4].

Таблица 1

Свойства выделенных штаммов светящихся бактерий

Штамм светящихся бактерий	Рост/ люминесценция				Пигмент	Оксидаза	Сахара				
	4 °C	25°C	30°C	37°C			Глюкоза	Маннит	Сахароза	Лактоза	Мальтоза
***P. leiognathi* W1**	-/-	+/+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	-	-
***P. leiognathi* W2**	-/-	+/+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	-	-
***P. leiognathi*W3**	-/-	+/+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	-	-
***P. leiognathi* Cr1**	-/-	+/+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	-	-
***P. leiognathi* Sh1**	-/-	+/+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	-	-
***P. leiognathi* F1**	-/-	+/+	+/+	+/+	-	-	+	-	-	-	-
P. phosphoreum	+/+	+/+	-/-	-/-	-	-	+	-	-	-	+
V. fischeri	-/-	+/+	+/+	-/-	+	+	+	+	-	-	+
V. harveyi	-/-	+/+	+/+	-/+	-	+	+	+	+	-	+

При первичной идентификации выделенных штаммов были исследованы температурные оптимумы роста и биолюминесценции, пигментация, люциферазная и оксидазная активности, способность ферментировать различные сахара, таблица 1 (результаты приведены в сравнении с выделенными ранее Черноморскими штаммами *P. phosphoreum, V. fischeri u V. harveyi*).

Таблица 2

Кинетика люциферазных реакций выделенных штаммов

Штамм	Время полузатухания биолюминесценции, с			Тип кинетики
	Тетрадеканаль	Додеканаль	Деканаль	
P. leiognathi W1	0,70	1,50	1,50	Быстрый
P. leiognathi W2	0,55	1,50	1,50	Быстрый
P. leiognathi W3	0,60	1,50	1,50	Быстрый
P. leiognathi Cr1	0,65	1,50	1,80	Быстрый
P. leiognathi Sh1	0,65	1,50	2,00	Быстрый
P. leiognathi F1	0,50	1,50	1,50	Быстрый
Средние значения				
P. leiognathi	**0,61±0,07**	**1,50±0**	**1,63±0,22**	Быстрый
V. fischeri	**0,61±0,048**	**1,55±0,29**	**3,64±1,73**	Быстрый
P. phosphoreum	**1,72±0,40**	**3,97±0,58**	**4,72±0,40**	Средний
V. harveyi	**0,82±0,082**	**7,80±3,27**	**2,47±0,058**	Медленный

Также была изучена кинетика люциферазной реакции с тремя альдегидами, которая при использовании додеканаля, является одним из специфических для светящихся бактерий диагностических показателей [2, 4]. Исследования показали, что выделенные штаммы обладают быстрым кинетическим типом, характерным для рода *Photobacterium*и некоторых видов рода *Vibrio*(Таблица 2). Отсутствие у бактерий желтого пигмента, который является диагностическим свойством вида *V. fischeri*, а также их неспособность ферментировать маннит, позволяют отнести выделенные штаммы к роду *Photobacterium*. Высокий температурный оптимум роста и биолюминесценции и отсутствие ферментации мальтозы свидетельствуют о наиболее вероятной принадлежности идентифицируемых бактерий к виду *P. leiognathi.*

Проведенные исследования по фенотипированию с использованием 96 субстратов системы Biolog (США) подтвердили близость выделенных бактерий к виду *P. leiognathi*, рис. 1. Однако образованный ими кластер значительно отличался от имеющихся в базе данных сведений об известных видах светящихся бактериях, что означает возможную принадлежность штаммов к новому виду или о более широкой вариабельности вида *P. leiognathi*.

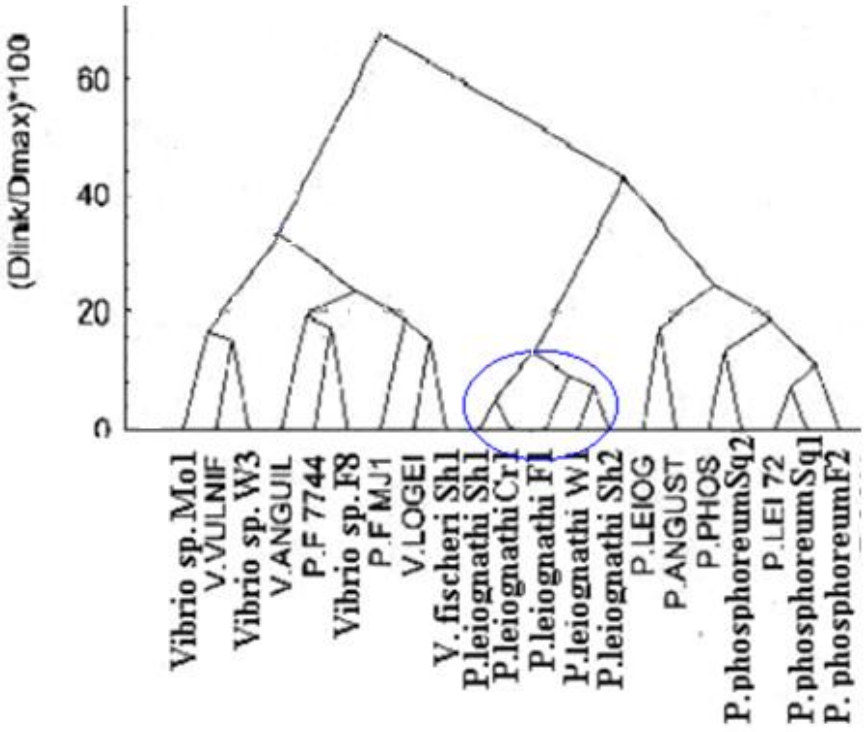

Рис. 1. Кластерный анализ фенотипов выделенных штаммов светящихся бактерий с использованием системы идентификации микроорганизмов Biolog (США).

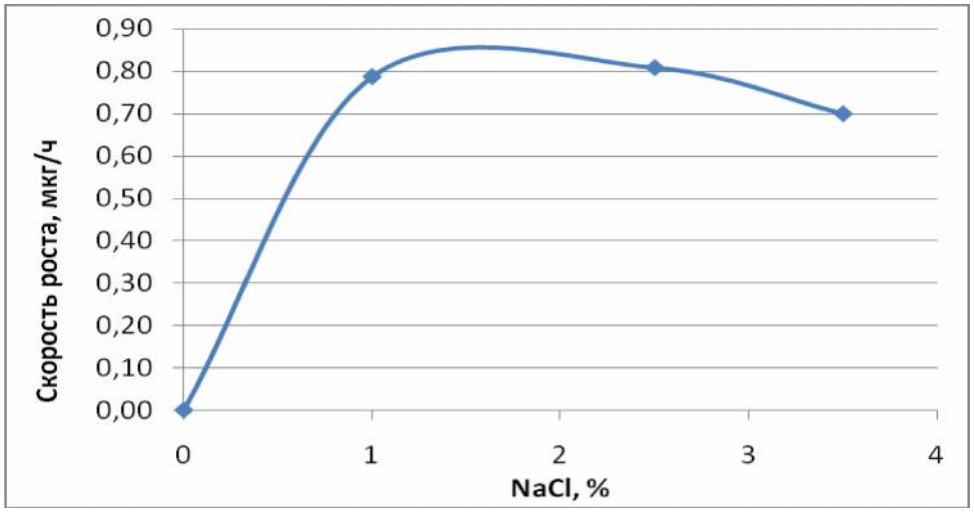

Рис. 2. Изучение скорости роста выделенных штаммов при различных концентрациях соли.

Проведенные исследования показали также, что светящиеся бактерии Азовского моря обладают более высокой метаболической активностью при более низкой концентрации соли в среде, эквивалентной 40% от солености океана [5].

Для большинства изучаемых штаммов максимальное количество биомассы накапливалось при концентрации хлорида натрия в среде 1 - 1,5%, а при концентрации соли более 2%, количество биомассы снижалось для всех выделенных штаммов, рис. 2. Такая же закономерность наблюдалась и при анализе способности метаболизировать субстраты системы Biolog. Максимальная люминесценция бактерий проявлялась при более высоких значениях солености, чем их рост. Удельное свечение бактерий возрастало при увеличении концентрации соли от 1 до 3%, достигая максимума, который сохранялся и при более высоких значениях солености 3–5%.

В этих условиях бактерии обладали максимальной биолюминесценцией, сравнимой с самыми яркими штаммами *P. phosphoreum*, интенсивность которой зависела от штамма (таблица 3).

Таблица 3

Биолюминесценция выделенных штаммов светящихся бактерий

Штамм	Концентрация клеток кл/мл	Биолюминесценция	
		мВ/мл	мВ/кл
P .leiognathi W1	$4{,}80\cdot10^{7}$	$1{,}34\cdot10^{5}$	$2{,}80\cdot10^{-3}$
P .leiognathi W2	$4{,}50\cdot10^{7}$	$1{,}34\cdot10^{5}$	$2{,}99\cdot10^{-3}$
P. leiognathi W2	$4{,}20\cdot10^{7}$	$1{,}35\cdot10^{5}$	$3{,}21\cdot10^{-3}$
P. leiognathi Sh1	$3{,}90\cdot10^{7}$	$1{,}14\cdot10^{5}$	$2{,}93\cdot10^{-3}$
P. leiognathi Cr1	$5{,}40\cdot10^{7}$	$1{,}38\cdot10^{5}$	$2{,}56\cdot10^{-3}$
P. leiognathi F1	$4{,}50\cdot10^{7}$	$1{,}28\cdot10^{5}$	$2{,}84\cdot10^{-3}$
Средние значения			
P. leiognathi	$4{,}55\cdot10^{7}$	$1{,}31\cdot10^{5}$	$2{,}89\cdot10^{-3}$
P. phosphoreum	$2{,}64\cdot10^{7}$	$1{,}00\cdot10^{5}$	$3{,}96\cdot10^{-3}$
V. fischeri	$1{,}26\cdot10^{8}$	$1{,}04\cdot10^{5}$	$8{,}60\cdot10^{-4}$
V. harveyi	$2{,}41\cdot10^{8}$	$9{,}21\cdot10^{4}$	$3{,}82\cdot10^{-4}$

Таким образом, выделенные штаммов светящихся бактерий отличают высокие температурные оптимумы, повышенная метаболическая активность при пониженных значениях солености, а также высокие значения удельной биолюминесценции. Отмеченные особенности делают эти бактерии перспективными тест-обьектами для биотестирования в физиологических условиях, при которых концентрация хлорида натрия близка к 0,9% и температура составляет 37 °С. Известные морские (или океанические)тест-штаммы обычно не дают возможности проводить такие исследования, так как для их оптимальной люминесценции требуется высокая концентрация хлорида натрия (3-3,5%) и относительно невысокие температуры (15–25°С) [6].

ВЫВОДЫ

1. Выделены и идентифицированы как *Photobacteriumleiognathi* шесть штаммов светящихся бактерий из Азовского моря.

2. Установлены высокая термофильность и пониженная галофильность выделенных бактерий, что делает их перспективными тест-обьектами для биотестирования в физиологических условиях.

3. Фенотипирование светящихся бактерий с помощью системы Biologпоказали, что они образуют отдельный кластер, отличный от известных, что позволило предположить принадлежность бактерий к новому виду или большей вариабельности вида *P.leiognathi.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Doherty F. G. A review of the microtox toxicity test system for assessing the toxicity of sediments and soils / F. G. Doherty // Water Qual. Res. J. Canada. – 2001. – Vol. 36. – P. 475–518.

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

3. Ulitzur S. Natural Luminescent Whole-Cell Bioreporters / S. Ulitzur // Handbook of Biosensors and Biochip. – John Wiley & Sons, Ltd., 2007 – P. 143-153.

4. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 3-d edition: Proteobacteria: Gamma subclass / [ed. by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, et al.]. – 2006. - Vol. 6. – 1165 p.

5. Кацев А. М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А. М. Кацев, Джон Макемсон // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, хи-

мия». – 2006. – Т. 19, №4. – С. 111–116.

6. Дерябин Д.Г. Причины, определяющие характер изменения бактериальной люминесценции при воздействии сыворотки крови / Д.Г. Дерябин, Е.Г. Поляков // Микробиология. – 2005. – № 5. – С. 616–625.