

## **Исследование изменения состава люминесцирующей кишечной микрофлоры рыб в зависимости от температуры среды обитания**

Д. С. Буркатовский<sup>1</sup>, С. В. Баженов<sup>1</sup>, М. Н. Коноплева<sup>1</sup>, И. В. Манухов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

В данной работе проводился поиск и исследование новых штаммов психрофильных морских люминесцирующих бактерий, изолированных в разные сезоны года и на разных морских глубинах. В ходе экспедиций в летний период 2016 г. с целью подтвердить изменения состава кишечной микрофлоры рыб в зависимости от глубины обитания, а также с целью провести поиск новых видов люминесцентных комменциалов и патогенов, были собраны образцы микрофлоры кишечника рыб в районах Белого, Берингова и Охотского морей. Зимой в Охотском море собрано 147 образцов кишечной микрофлоры бычка, морского огурца, трески, горбуши. Из них 30 образцов оказались люминесцирующими. Летом в Охотском море собрано 160 образцов кишечной микрофлоры ленка, бычка, морского ежа, горбуши, ерша, кунжи. Из них 25 оказалось светящимися. На Белом море было собрано 30 образцов кишечной микрофлоры бычка, наваги, трески, балянуса, камбалы, морской звезды и пескожила. Из них 15 образцов оказались люминесцирующими. Билюминесцентные бактерии, высевали на чашки Петри с агаризованной средой SWT (0,5% триптона, 0,25% дрожжевого экстракта, 1,5% морской соли и 0,3% глицерина). В результате нескольких пассажей пересева отобранных колоний с применением чередования жидкой и агаризованной сред SWT удалось расчистить 57 билюминесцентных изолята. Морские бактерии растили на среде SWT при температуре 4°C. Из люминесцентных изолятов выделили хромосомальную ДНК с целью последующего молекулярно-генетического анализа, включающего секвенирование гена *16S rRNA*.

Люминесценция клеток измерялась на люминометре LM-01T (Immunotech).

Хромосомную ДНК штаммов выделяли из клеток поздней логарифмической фазы роста методом лизиса лизоцимом и SDS с последующей обработкой фенолом и переосаждением в этаноле.

С целью идентифицировать полученные образцы с точностью до рода провели филогенетический анализ последовательностей *16S rRNA* новых изолированных светящихся бактерий наряду с люминесцирующими психрофильными штаммами, имеющимися в распоряжении ВКПМ ФГУП ГосНИИгенетика (рис.1). Для этого применяли праймеры, TGCAGCCCACTCCCATGGTGTGAC и CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG<sup>[1][2]</sup>, с помощью которых проводили амплификацию и секвенирование.

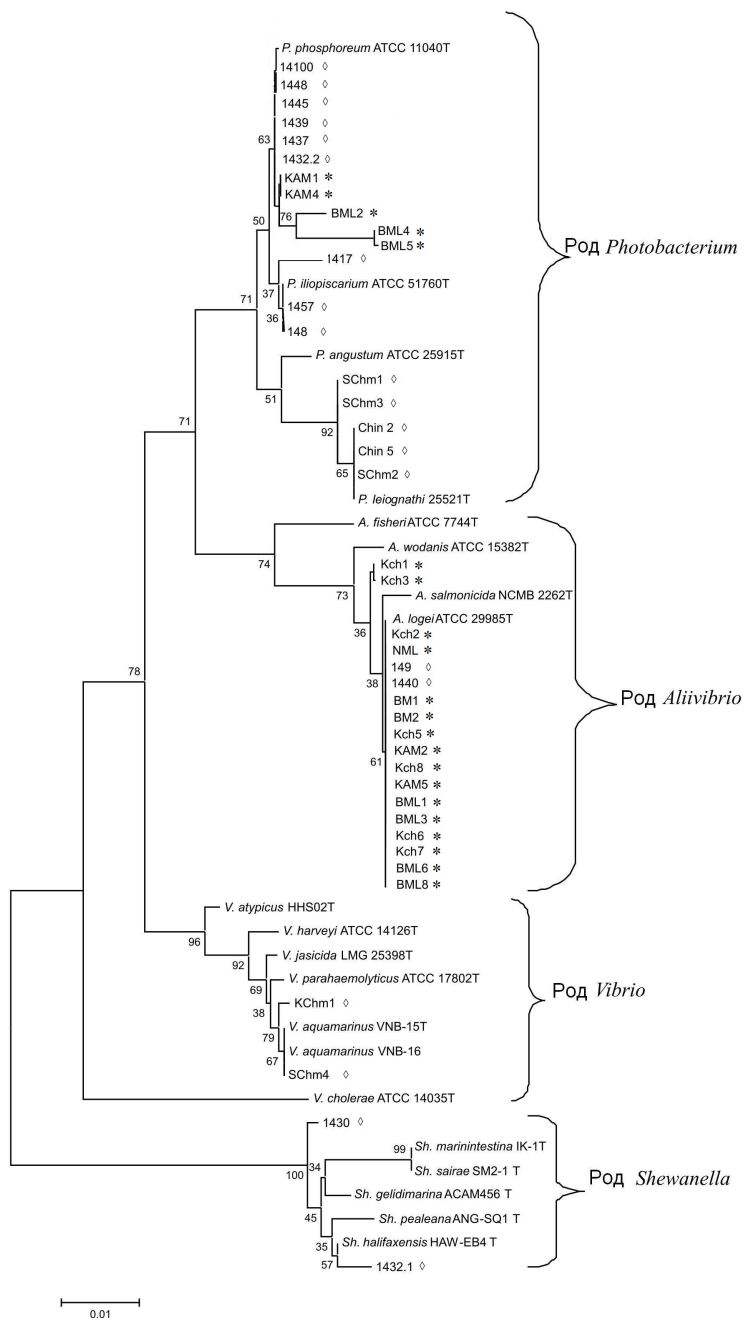


Рисунок 1. Филогенетический анализ новых изолированных биолюминесцентных штаммов и референсных штаммов, построен на основе нуклеотидной последовательности 16S rRNA. Филогенетическое дерево строили методом Neighbor-Joining в программе «Мега 5.2». В зимний период 2010 г. выделены штаммы морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море, мыс Левашова: NML – навага, KCh1, BML1- BML6, BML8 – бычок, КАМ1-4 – из камбалы; в Беринговом море района оз. Калагирь: KCh2, KCh3, KCh5-KCh8 – корюшка; в Белом море ВМ1, ВМ2– керчак. В летний период 2014 г. изолированы штаммы морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море, мыс Левашова: 148, 1430 – горбуша, 149, 1432.1, 1432.2, 1437, 1439 – навага, 1417 – кета, 1445 – камбала, 1448 – керчак; в Беринговом море: 1440 – керчак, 1457, 14100 – горбуша; в Чёрном море: SChm1, SChm2, SChm3, SChm4 – ставрида, KChm1 – керчак; в Южно-Китайском море, о. Хайнань: Chin2, Chin5. 1430 и 1432.1 – не люминесцируют.

\*- штаммы, изолированные в зимний период,

◊- штаммы, изолированные в летний период.

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе «Терцик» (ДНК-технология, Россия) (температура плавления — 92°C, температура отжига — 72°C, температура элонгации — 60°C, 30 циклов). Выделение и очистку ПЦР продуктов проводили с использованием набора DNA extraction kit (“МВІ Fermentas”, Литва).

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили с помощью дидезоксинуклеотидтрифосфатов по Сэнгеру.

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов проводили с гомологичными последовательностями стандартных (референсных) штаммов *Aliivibrio logei* ATCC29985T, *Aliivibrio fischeri* ATCC7744T и *A. salmonicida* ATCC 43839T. Корректировку хроматограмм последовательностей нуклеотидов и их анализ проводили в программе Vector NTI 9. Сравнение результатов секвенирования до вида проводили с помощью BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для построения филогенетических деревьев использовали программу MEGA5.2. Филогенетические деревья строились методом ближайших соседей<sup>[3]</sup>. С точностью до вида штаммы определяли на основании данных филогенетического анализа последовательностей нуклеотидов, фенотипических и биохимических показателей (Рис. 1).

Выявленные виды бактерий *A. logei* и *P. phosphoreum* являются психрофилами. Возможные патогенные бактерии акваторий холодных морей не обнаружены. Следует отметить, что для психрофильных бактерий *A. logei* характерна регуляция экспрессии генов системой QS (Quorum sensing) первого типа в зависимости от плотности популяции бактериальных клеток. У психрофильных бактериях *P. phosphoreum* такая система отсутствует. Можно предположить, что преимущественное преобладание микроорганизмов вида *A. logei* над *P. phosphoreum* в условиях более низких зимних температур обусловлено именно наличием системы QS, регулирующей экспрессию *lux*-оперона. Наличие *lux*-оперона вносит свой вклад при успешном заселении люминесцентными бактериями животных-хозяев<sup>[4]</sup>. Благодаря QS регуляции бактерии имеют возможность скоординировано отвечать на изменения во внешней среде в зависимости от собственной плотности. Следует отметить особенности существования микроорганизмов, *P. phosphoreum* являются свободноживущими бактериями или комменциалами у рыб, обитая в его кишечнике в то время как *A. logei* представляют собой симбионтов для ряда животных-хозяев<sup>[4]</sup>.

Таким образом, было показано видовое замещение бактерий, вызванное сменой сезонной температуры поверхностных вод акваторий Берингова и Охотского морей: с повышением температуры летом бактерии *P. phosphoreum* вытесняют представителей *A. logei*, преобладающих в зимний период низких температур. Показано, что видовое замещение происходит ежегодно на выборках с 2010 по 2016 годы.

Преобладание *A. logei* в холодный период, по-видимому, обеспечено наличием QS системы регуляции экспрессии генов *lux*-оперона, способствующей заселению органов животного-хозяина. Свободноживущие *P. phosphoreum*, не обладающие этой системой, очевидно в холодные сезоны года неактивны. Т.е. в зависимости от сезона, виды психрофильных бактерий в кишечнике рыб холодных

морей сменяют друг друга – с преобладанием кворум сенсинг-способных психрофильных видов зимой и свободно живущих психрофильных видов – летом. Очевидно, что летом свободноживущие *P. phosphoreum* используют кишечник холодноводных рыб как оппортунистическую нишу, где они в условиях летнего прогрева воды способны конкурировать с люминесцентными QS-способными видами.

### Литература

1. М.Н. Коноплёва, С.А. Хрульнова, М.С. Осетрова, Д.И. Дёгтев, И.В. Манухов, Г.Б. Завильгельский Анализ люминесцирующей микрофлоры кишечника рыб студёных морей: Белого, Берингова и Охотского. – Труды ВНИРО – 2015 г. - Т. 157
2. S. A. Khrulnova, I. V. Manukhova, A. P. Zarubinab, G. B. Zavlghelsky Aliivibrio logei KCh1 (Kamchatka Isolate): Biochemical and Bioluminescence Characteristics and Cloning of the lux Operon. – Microbiology – 2010. – Vol. 79 – No. 3 – pp. 349–355
3. N. Saitou & M. Nei The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. – Mol Biol Evol 4. – 1987. – pp. 406–425.
4. E.G. Ruby, M.J. McFall-Ngai – Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri* – 1999. – Trends Microbiol. (10):414-20.