

С.Л. САФРОНЮК, Э.Т. ШАРИПОВ, А.М. КАЦЕВ

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Республика Крым

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКВАТОРИИ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ***Исследование выполнено частично при финансовой поддержке РФФИ и Совета министров Республики Крым в рамках научного проекта №17-44-92035***В работе изучены особенности фенотипа десяти изолятов светящихся бактерий, выделенных из воды и фауны Черного и Азовского морей. По результатам проведенных исследований четыре штамма первично идентифицированы как вид *Allivibrio fischeri*, три отнесены к виду *Photobacterium leiognathi* и три – к виду *Vibrio harveyi*.****Ключевые слова:** *люминесцентные бактерии, Allivibrio fischeri, Photobacterium leiognathi, Vibrio harveyi**Сафронюк Сергей Леонидович – аспирант кафедры медицинской и фармацевтической химии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». E-mail: pharmlab01@mail.ru**Шарипов Эдем Тахирович – аспирант кафедры медицинской и фармацевтической химии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». E-mail: edemsharipov@gmail.com**Кацев Андрей Моисеевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». E-mail: ketsev@mail.ru*

S.L. SAFRONYUK, E.T. SHARIPOV, A.M. KATSEV

V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Republic of Crimea

**IDENTIFICATION OF LUMINOUS BACTERIA ISOLATED FROM THE BLACK AND THE AZOV SEAS****The article studies phenotype of ten isolates of luminous bacteria isolated from water and fauna of the Black and Azov Seas. The following findings were obtained: four strains were identified as representatives of species *Allivibrio fischeri*, three strains were the representatives of species *Photobacterium leiognathi* and another three has been identified as *Vibrio harveyi*.****Key words:** *luminescent bacteria, Allivibrio fischeri, Photobacterium leiognathi, Vibrio harveyi**Safronyuk Sergey Leonidovich – Postgraduate student, Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry of the Medical Academy n.a. S.I. Georgievsky, Vernadsky CFU. E-mail: pharmlab01@mail.ru**Sharipov Edem Tabirovich – Postgraduate student, Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry of the Medical Academy n.a. S.I. Georgievsky, Vernadsky CFU. E-mail: edemsharipov@gmail.com**Katsev Andrey Moiseevich – Doctor of Biology, Professor, Head of the Medical and Pharmaceutical Chemistry Department, Medical Academy n.a. S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU. E-mail: ketsev@mail.ru*

Современным аналитическим подходам по обнаружению химических веществ свойственны такие недостатки, как: длительное время обнаружения, высокая стоимость оборудования и реагентов для анализа объектов, а также затрат на обучение и подготовку специализированного персонала [8]. Разработка и внедрение простого и недорогого скрининг-теста для быстрого анализа образца является одним из перспективных и востребованных направлений современных аналитических технологий. Так, методы с использованием биолюминесцентных

тест-систем, соответствуют всем этим характеристикам и нашли широкое применение для обнаружения и изучения биологических свойств химических соединений [1].

Широкое использование светящихся организмов и тест-систем на их основе в последние десятилетия связано с тем, что биолюминесценция является общим показателем метаболизма клетки. Большое количество факторов, влияющих на рост, дыхание и биолюминесценцию клетки, может быть измерено посредством её регистрации [5].

Биоломинесценция представляет собой форму хемилюминесценции, генерируемой светящимися организмами, которые представлены большим количеством видов у 800 различных родов [1, 9]. Одни из самых известных представителей светящихся организмов – люминесцентные бактерии, большинство которых являются морскими представителями. Поскольку светящиеся бактерии приобрели разнообразные фенотипические признаки в ходе филогенеза, и как следствие, имеют различную чувствительность к химическим соединениям, поисковых штаммов для анализа веществ различной природы представляет собой особый интерес.

**Цель исследования:** изучение фенотипических особенностей люминесцентных бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей, для их первичной идентификации.

### Методика исследования

Выделение люминесцентных бактерий из акваторий Черного и Азовского морей проводили в летне-осенний период путем забора образцов воды и объектов морской фауны, таких как черноморская мидия (*Mytilus galloprovincialis*), бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus*), морской двустворчатый моллюск (*Cerastoderma lamarcki*), бычок-кнут (*Mesogobius batrachocephalus*), креветка обыкновенная (*Crangon crangon*) и бычок песочник *Neogobius fluviatilis pallasii*. Отбранные пробы воды фильтровали через мембранные бактериологические фильтры (мембраны типа МФАС–ОС, диаметр пор = 0,22 мкм, ЗАО НТЦ «Владипор», Россия), а полученный биоматериал механически измельчали до кусочков размером 0,5 см. Подготовленные образцы помещали на плотные питательные среды (HiMedia M002, Индия) с 3% содержанием натрия хлорида (НПФ «Невский химик», Россия) и культивировали при температуре (t) +25°C в течение 16-24 часов в термостате (ТСО-1/80 СПУ, Россия) [5]. Выросшую биомассу оценивали на наличие светящихся зон в темной комнате. В случае обнаружения таких областей из них выделяли и очищали светящиеся микроорганизмы при помощи комплекса стандартных микробиологических методов [2].

Изучение морфофизиологических и биохимических свойств микроорганизмов для их последующей дифференцировки проводили по основным фенотипическим признакам семейства *Vibrionaceae* [4]. Морфо-культуральные характеристики светящихся изолятов изучали визуально и при помощи световой микроскопии. На плотных питательных

средах зрительно оценивали величину, форму, цвет, консистенцию, контур края, структуру и характер поверхности колоний. Изучение морфологии бактерий под микроскопом проводили в нативных и окрашенных по Граму препаратах [2].

Физиологические свойства изолятов оценивали температурным оптимумом роста при их культивировании на жидких питательных средах (HiMedia M001, Индия), содержащих 3% натрия хлорида, при +4°C, +20°C, +25°C, +35°C и +37°C в течение 24 часов.

Биохимические свойства бактерий оценивали с использованием сред Гисса по их способности ферментировать такие субстраты, как глицерин, D (+)-маннит, сахарозу, D (+)-глюкозу, D (+)-мальтозу, D (+)-маннозу и D (+)-лактозу (AppliChem, Германия), концентрация которых составила 0,5% в пробе [2]. Каталазную активность изучаемых изолятов оценивали по реакции культивированной в течение ночи колонии клеток на питательном агаре при нанесении на ее поверхность 0,01 мл 3% раствора перекиси водорода (AppliChem, Германия) [7]. Оксидазную активность изучали с помощью коммерческого теста (OXItest Mikrolatest, Erba Lachema s.r.o., Чехия). Тест-полоску смачивали 0,002 мл дистиллированной воды, после чего на индикаторную зону тест-полоски наносили исследуемую культуру клеток и через 0,5-1 мин наблюдали за изменением окраски.

Одним из подходов для изучения биохимических свойств изолятов в работе использовали метод, основанный на определении типа кинетики люциферазной реакции [3]. Для этого проводили накопления биомассы бактерий путем их культивирования в 500 мл жидкой питательной среды при постоянном перемешивании в течение 24 часов. Полученную систему центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин в ОПН-8, удаляя супернатант. Оставшуюся в виде осадка массу клеток суспендировали в 5 мл натрий-фосфатном буфере с рН = 7,2±0,1 и подвергали осмотическому лизису путем очередного замораживания и оттаивания бактериальной суспензии. После трехкратного повторения данной процедуры вновь центрифугировали систему. Осаждение белков проводили ступенчатым насыщением полученного супернатанта аммонием сульфатом от 20 до 80% (НПФ «Невский химик», Россия). Кинетику затухания люциферазной реакции изучали в присутствии додеканала (Fluka, Швейцария). Анализируемая система состояла из 0,05 мл 0,01% водно-спиртовой эмульсии

альдегида, 0,5 мл натрий-фосфатного буфера с  $\text{pH}=7,2\pm 0,1$  и 0,05 мл ферментного препарата с экспериментально подобранной концентрацией. Инициацию реакции проводили быстрым введением 0,5 мл раствора  $10^{-5}$  моль/л фотовосстановленного ФМН<sub>2</sub> (AppliChem, Германия), содержащего  $10^{-7}$  моль/л ЭДТА (AppliChem, Германия). По полученным данным определяли время полужатухания ( $t_{1/2}$ ), по значениям которого рассчитывали константу скорости люциферазной реакции ( $K_{\text{LR}}=1/t_{1/2}$ ) как? характерный

систематический признак для люминесцентных бактерий [6].

#### Результаты исследования и обсуждение

В результате полевых и лабораторных исследований удалось выделить десять образцов культур клеток со стабильным свечением, которым были присвоены кодовые названия. Данные о районах и объектах выделения, присвоенные кодировки десяти люминесцентным изолятам и наличие у них желтого пигмента представлены в таблице 1.

Таблица 1

Данные о выделенных светящихся изолятах

Код изолята	Район получения биоматериала	Вид материала	Наличие желтого пигмента
M1	г. Ялта	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	нет
Fsh	г. Щелкино	<i>Neogobius melanostomus</i>	нет
C1	г. Щелкино	<i>Cerastoderma lamarcki</i>	есть
Fy	г. Ялта	<i>Mesogobius batrachocephalus</i>	есть
Sh1	г. Щелкино	<i>Crangon crangon</i>	нет
F1	пгт. Партенит	<i>Neogobius fluviatilis pallasii</i>	есть
Wsh	г. Щелкино	Вода	нет
Wy	г. Ялта	Вода	есть
W2	пгт. Партенит	Вода	нет
Ms3	г. Ялта	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	нет

Колонии выделенных бактерий на плотных питательных средах у всех изучаемых объектов характеризовались слизистой консистенцией, аморфной структурой, гладкой и выпуклой поверхностью с ровным краем в форме круга. При оценке размеров образующихся колоний после 24-часового культивирования микроорганизмов на питательном агаре все изоляты разделили на три группы: крупные колонии диаметром ( $d$ ) от 5 мм и более образовывали бактерии с кодами C1, Wsh и Ms3; среднего размера ( $d = 3-5$  мм) колонии характеризовались Sh1, M1, Fsh, F1, W2, и мелкие и/или точечные колонии, для которых  $d \leq 3$  мм, обладали изоляты Wy, Fy. При микроскопии нативных препаратов исследуемых бактерий установили, что все они подвижны и имеют палочковидную форму. При окраске изолятов по методу Грама их тинкториальные свойства соответствовали грамотрицательным бактериям.

При культивировании выделенных изолятов в жидких питательных средах при  $t=+4^{\circ}\text{C}$  не удалось зарегистрировать свечения и увеличения биомассы клеток.

В то же время в остальном диапазоне изучаемых температур микроорганизмы характеризовались наличием люминесценции и приростом общего числа клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что среди выделенных образцов нет представителей видов *Vibrio logei* и *Photobacterium phosphoreum* [1].

При изучении биохимических свойств выделенных чистых культур светящихся бактерий выявили их индивидуальные особенности по способности к ферментации заданных субстратов, а также по наличию каталазной и оксидазной активности, которые представлены в таблице 2.

Сравнительный анализ результатов проведенных исследований позволил первично идентифицировать пять изолятов. Бактерий F1, Wsh и Fy в экспериментах по изучению ферментативных свойств окисляли маннит, глюкозу, D (+)-мальтозу и D (+)-маннозу, они обладали желтым пигментом и каталазной активностью, а также характеризовались люминесценцией и увеличением биомассы при температурах от  $+20^{\circ}\text{C}$  до  $+37^{\circ}\text{C}$ . Они не образовывали кислот и/или газа при наличии в про-

Биохимические свойства изучаемых изолятов

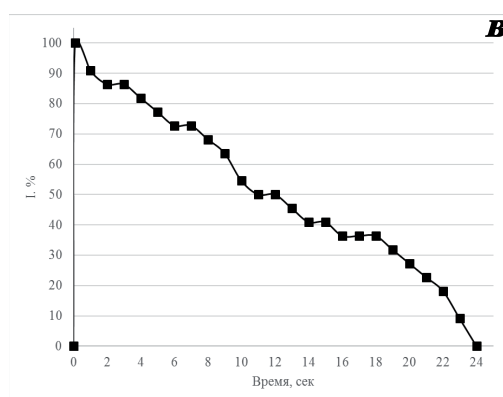
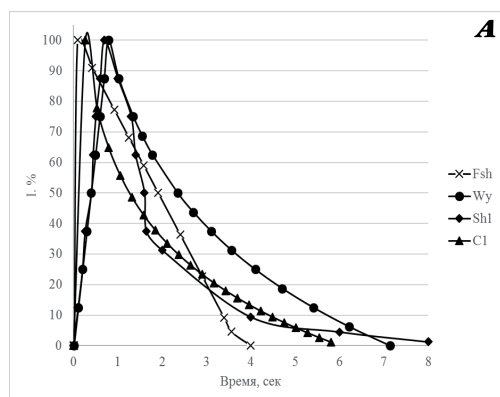
Параметр \ код изолята	Sh1	M1	Fsh	C1	F1	Wsh	Wy	Fy	Ms3	W2
контроль	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
глицерин	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
маннит	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
сахароза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-мальтоза	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
D(+)-манноза	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D(+)-лактоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Каталазная активность	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Оксидазная активность	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Примечание: «+» – сахар ферментируется или фермент присутствует, «-» – сахар не ферментируется или фермент отсутствует.

бах глицерина, сахарозы и D (+)-лактозы. Наличие всех этих признаков указывает на характерные фенотипические свойства такого вида, как *A. fischeri*. Изоляты с кодировкой Ms3 и W2 отнесли к виду *V. Harveyi*, поскольку они ферментировали все субстраты кроме лактозы, а также обладают каталазной и оксидазной активностью. У этих культур клеток не наблюдали желто-

го пигмента, а увеличение биомассы и люминесценции регистрировали в диапазоне  $t=+20^{\circ}\text{C} - +37^{\circ}\text{C}$ .

Для первичной идентификации остальных изолятов провели проверку кинетических характеристик люцифераз, результаты которой представлены в виде графических зависимостей интенсивности свечения от времени на рисунке 1.



**Рис. 1. Протекание реакции затухания люциферазной активности в присутствии додеканала: А - быстрая кинетика для изолятов C1, Sh1, Wy, Fsh. В - Медленная кинетика для изолята M1**

По времени полузатухания люциферазной реакции рассчитали  $K_{LR}$ , по значениям которой определили тип кинетики – характерный систематический признак для люминесцентных бактерий. Изоляты с кодом C1, Sh1, Wy, Fsh характеризовались быстрым типом кинетики, при  $K_{LR}=0,75\text{ с}, 0,83\text{ с}, 0,51\text{ с}, 0,52\text{ с}$  соответственно, а изолят M1 – медленной кинетикой с показателем  $K_{LR}=0,091\text{ с}$  [9].

Таким образом, изоляты с кодировкой Sh1, Wy, Fsh отнесли к виду *P. Leiognathi*, поскольку они ферментировали только глюкозу и маннозу, не обладали желтым

пигментом и каталазной активностью, а также характеризовались  $K_{LR}$  больше чем 0,5 с. Изолят M1 окислял маннит, глюкозу, D (+)-мальтозу, D (+)-маннозу, обладал каталазной и оксидазной активностью, но не ферментировал сахарозу – один из основных субстратов вида *V. barveyi* [6]. При изучении кинетических свойств люцифераз  $K_{LR}$  M1 составила 0,91 с. Совокупность данных показателей позволила предположить принадлежность изолята M1 к виду *V. barveyi*. Изолят C1 отнесли к виду *A. Fischeri*, поскольку при изучении ферментативных свойств он окис-

для только глюкозу, характеризовался  $K_{LR} = 0,75$  с и положительным ответом в оксидазном тесте, а также содержал желтый пигмент.

#### Заключение

В результате отбора проб воды, рыбы, креветок и моллюсков из прибрежных зон Черного и Азовского морей, выделения из них светящихся микроорганизмов удалось получить десять стабильных, чистых образцов люминесцентных бактерий.

При изучении морфологических особенностей, выделенных изолятов на плотных и жидких питательных средах выявлены отличия только в размере колоний и наличие желтого пигмента. Бактерии с кодом C1, Wsh и Ms3 образовывали колонии  $d \geq 5$  мм. Штаммы Sh1, M1, Fsh, F1, W2 характеризовались колониями, для которых  $d=3-5$  мм, а  $d \leq 3$  мм обладали Wy, Fy. Скопления клеток изолятов C1, Fy, F1, и Wy имели желтый пигмент.

Все выделенные изоляты характеризовались оптимумами роста при  $t$  от +20 до +37°C, что явилось основанием для исключения их принадлежности к психрофильным видам *V. logei* и *P. phosphoreum*.

Биохимические свойства исследуемых объектов имели следующие особенности: бактерии Ms3, W2, Fsh, Wsh ферментировали глицерин. M1, F1, Wsh, Fy, Ms3, W2 расщепляли маннит и мальтозу, Ms3, W2 – сахарозу. Только C1 не ферментировал маннозу. Все изоляты окисляли глюкозу. Ms3, W2, M1, Wsh обладали каталазной активностью, а Sh1, M1, Fsh, C1, F1, Wsh, Fy, Ms3 содержали оксиредуктазы.

По результатам изучения скорости затухания люциферазной реакции в присутствии додеканаля быстрым типом кинетики характеризовались изоляты C1, Sh1, Wy, Fsh при  $K_{LR}$  равной 0,75 с, 0,83 с, 0,51 с, 0,52 с соответственно, а медленным типом – M1 с  $K_{LR} = 0,091$  с.

По результатам проведенных исследований удалось первично идентифициро-

вать все выделенные изоляты. Согласно таксономике люминесцентных микроорганизмов, к виду *A. fischeri* отнесли F1, Wsh, Fy и C1, к *V. harveyi* – Ms3, W2 и M1, а к *P. leiognathi* – Fsh, Sh1 и Wy.

*Конфликт интересов отсутствует.*

#### Список литературы

1. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. – Новосибирск: Наука, 2009. – 245 с.
2. Зверев В.В. Микробиология, вирусология. Руководство к практическим занятиям / Под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М: Геотар-Медиа, 2017. – 360 с.
3. Кацев А.М. Ферментативная активность светящихся бактерий Черного и Азовского морей и их антиоксидантная защита // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Сер. Биология. Химия. – 2014. – Том 27. – № 3 (66). – С. 184-193.
4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: *The Proteobacteria*, Part B, *The Gammaproteobacteria*. Editor-in-chief George Garrity Springer US. – 2005. – 1203 p.
5. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial. // Analytica Chimica Acta. – 2016. – Vol. 934. – P. 22-35.
6. Deeva A.A., Temlyakova E.A., Sorokin A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32 (20). – P. 3053-3057.
7. Dong W., Hou Y., Li S., Wang F., Zhou J., Li Z., Wang Y., Huang F., Fu L., Huang Y., Cui Z. Purification, cloning, expression, and biochemical characterization of a monofunctional catalase, KatP, from *Pigmentiphaga* sp. DL-8. // Protein Expression and Purification. – 2015. – Vol. 108. – P. 54-61.
8. Je H.J., Kim M.G., Kwon H.J. Bioluminescence Assays for Monitoring Chondrogenic Differentiation and Cartilage Regeneration // Sensors (Basel). – 2017. – Vol. 17(6). – P. 1306.
9. Steven H.D. Haddock, Mark A. Moline, James F. Case. Bioluminescence in the Sea // Annual Review of Marine Science – 2010. – Vol. 2 – P. 443-493.