

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *AEROMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛЛЮСКОВ-БИТИНИИД И ВОДОЕМА

**Цель исследования:** определение видовой структуры и особенностей биологических свойств аэромонад, изолированных из воды и моллюсков семейства *Bithyniidae*.

Материалом для исследования послужили моллюски и вода из места их обитания. Сбор материала производился на реке Ирюм (Обь-Иртышский бассейн) в летний период. Всего выделено 176 штаммов бактерий рода *Aeromonas*. Видовую идентификацию микроорганизмов осуществляли по прямому белковому профилированию с помощью масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics®). Наличие гемолизина, лецитиназы, плазмокоагулазы и лизоцима были исследованы по общепринятым методикам. Антилизозимную активность бактерий оценивали по методике Бухарина О.В. с соавт. (1999), биопленкообразование – по G. O, Tool et al. (2000).

Исследован таксономический состав и биологические свойства бактерии рода *Aeromonas* выделенных из битинид и среды их обитания (вода). У моллюсков выделялись такие виды как *A. veronii*, *A. hydrophyla*, *A. ichthiosmia*, а из воды – *A. veronii*, *A. ichthiosmia*, реже – *A. cavia*. Выделенные штаммы обладали гемолитической, лецитиназной активностью и не имели лизоцимной и плазмокоагулазной активности. Выраженность антилизозимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas* варьировала в зависимости от источника выделения культур.

Установлено, что бактерии рода *Aeromonas* широко представлены в микросимбиозе как моллюсков-битинид, так и воды и обладают комплексом биологических свойств способствующих адаптации микроорганизмов к среде их обитания. Полученные данные вносят вклад в расшифровку механизмов формирования, поддержания и функционирования ассоциативного микропаразитоза.

**Ключевые слова:** ассоциативный симбиоз, микросимбиоз, моллюски, бактерии рода *Aeromonas*.

Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в окружающей среде, их выделяют из речной воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов, растений, теплокровных животных. Поэтому долгое время их считали сапрофитами, но исследования последних лет позволяют отнести их к условным патогенам, вызывающим при определенных условиях заболевания людей и животных. Контаминированные аэромонадами рыбное сырьё и продукция представляют собой источник пищевых и кормовых инфекций человека и животных [1]. Бактерии рода *Aeromonas* представляют серьезную проблему для многих стран Европы и Азии, в которых аэромонадная инфекция составляет от 1 до 10% острых кишечных заболеваний у взрослых и до 50% у детей. В США аэромонады являются причиной 13% острых кишечных инфекций. Одной из причин этого является то, что диагностические и профилактические бактериологические исследования предусматривают поиски и выделение лишь ограниченного числа патогенных микроорганизмов – в первую очередь возбудителей кишечных инфекций. Однако, этиологическое значение в

заболевании людей могут приобретать самые разнообразные микроорганизмы, среди которых и бактерии рода *Aeromonas* [2].

Одним из существенных условий развития живых организмов, независимо от уровня их организации, являются симбиотические взаимоотношения про- и эукариот. Моделью для изучения механизмов данных взаимоотношений может являться ассоциативный симбиоз моллюсков и бактерий. В настоящее время сведения о микрофлоре моллюсков, и в частности, битинид, малочисленны и не систематизированы [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9]. Очевидно, что благодаря фильтрационной активности моллюсков, часть микроорганизмов, находящихся в воде попадают в организм моллюска, становясь частью его микросимбиоза. Вместе с тем известно, что бактерии рода *Aeromonas* являются одними из типичных представителей микробиоты водоема, что делает их возможным кандидатом на роль бактерий, способных колонизировать моллюсков.

В связи с этим, целью данного исследования явилось изучение видового состава и биологических свойств (факторов патогенности,

антилизоцимной активности и биопленкообразования) бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков-битиниид и среды их обитания (водоема), что может иметь значение при расшифровке механизмов ассоциативного симбиоза про- и эукариот.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили моллюски семейства *Vithyniidae* и вода из места их обитания. Сбор материала производился на реке Ирюм, протекающей по территории Курганской и Тюменской областей (Обь-Иртышский бассейн) в летний период. Исследован видовой состав бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из 65 особей пресноводных переднежаберных моллюсков-битиниид, 39 из них отнесены к роду *Codiella* и 26 особей моллюсков к роду *Vithynia*.

С целью выделения бактерий, моллюсков многократно отмывали стерильной водопроводной водой (5 мл) соблюдая правила асептики, затем гомогенизировали в фарфоровой ступке, к суспензии добавляли 5 мл стерильной водопроводной воды, перемешивали и по 0,1 мл высевали на плотные питательные среды (Эндо, мясопептонный агар, кровяной агар, Сабуро). Также, производился посев 1 мл суспензии в тиогликолевую среду (объем среды 9 мл горячей и не горячей) с последующим высевом на кровяной агар.

Для анализа микробиологического состава среды обитания моллюсков посеяны пробы речной воды (место отбора битиниид) в жидкую питательную среду накопления ЛПС (лактозопептонная среда) с последующим высевом на среду Эндо.

Всего из моллюсков и мест их обитания выделено 176 штаммов бактерий рода *Aeromonas* семейства *Aeromonadoceae*.

Факторы вирулентности бактерий: наличие гемолизина, лецитиназы, плазмокоагулазы и лизоцима были исследованы у 54 штаммов по общепринятым методикам [10]. Антилизоцимную активность (АЛА) бактерий изучали по методике Бухарина О.В. с соавт. [11], биопленкообразование (БПО) микроорганизмов – фотометрическим методом по G. O, Tool et al. [12] на фотометре Elix808 (BioTech, США).

Видовую идентификацию бактерий осуществляли по прямому белковому профили-

рованию с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с использованием масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioTyper 3,0 (Bruker Daltonics, Германия). В исследование взяты штаммы с уровнем достоверности идентификации выше 2,0, что свидетельствует о точной видовой идентификации. Для каждого результата идентификации проводилась ссылка на NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Результаты статистически обработаны с использованием методов вариационной статистики в программах Biostat, Microsoft Office Excel, SPSS Statistics 17.0.

### Результаты:

В ходе исследования установлено, что бактерии рода *Aeromonas* семейства *Aeromonadoceae* были обнаружены в моллюсках и в среде их обитания (вода). Спектр выделенных бактерий рода *Aeromonas* был очень широк и представлен следующими видами: *A. veronii*, *A. hydrophyla*, *A. ichthiosmia*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. eucrenophila*, *A. media*, *A. cavia*, *A. giandaei*, *A. encheilia*.

Структура, выделенных из битиниид, представлена на рисунке. Лидирующее место в структуре видового состава аеромонад занимают *A. veronii*, *A. hydrophyla*, *A. ichthiosmia*. Разнообразие водных аеромонад более скудное, идентифицировано только 4 вида: *A. veronii*, *A. hydrophyla*, *A. ichthiosmia*, реже – *A. cavia*.

Изучение биологических свойств наиболее часто встречающихся видов аеромонад, выделенных из моллюсков и места их обитания показало, что абсолютно все выделенные штаммы обладали гемолитической активностью и характеризовались отсутствием лизоцима и плазмокоагулазы. По наличию лецитиназы отмечались некоторые различия у штаммов, выделенных из моллюсков и водных штаммов аеромонад, хотя они не имели статистически достоверных различий.

Известно, что адаптация микроорганизмов в среде обитания (биотопе хозяина) определяется наличием комплекса биологических свойств, среди которых способность инактивировать лизоцим и формировать биопленки являются универсальными факторами, способствующими выживаемо-

сти микробиоты и составляющими системообразующий фактор микросимбиоза [13].

Проведенные исследования позволили установить, что выраженность антилизоцимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas* не были связаны с их видовой принадлежностью, но при этом варьировали в зависимости от источника выделения штаммов (табл.).

Штаммы, изолированные от битинид проявляли более высокие значения антилизоцимной активности, показатель составил  $0,7 \pm 0,05$  мкг/мл\*ОП, в то время как аналогичный показатель водных штаммов аэромонад –  $0,5 \pm 0,04$  мкг/мл\*ОП. Что касается показателей биопленкообразования, культуры, выделенные из воды, имели более высокие значения –  $0,4 \pm 0,02$  OD450, по сравнению с подобными показателями у штаммов, изолированных из моллюсков –  $0,3 \pm 0,01$  OD450. При сравнении значений антилизоцимной активности и биопленкообразования штаммов аэромонад, выделенных из моллюсков

рода *Codiella* и *Bithynia* различия не были выявлены.

**Обсуждение**

Роль моллюсков в биоценологических взаимоотношениях велика и связана не только с тем, что они являются важнейшими компонентами системы самоочищения водоемов, но и способны поглощать из окружающей среды и накапливать в организме различную, в том числе и патогенную микрофлору. Известно, что через тело моллюска в процессе питания проходит значительное количество воды, при этом подавляющая часть бактерий, взвешенных в ней, остается в теле моллюска [14]. При снижении резистентности организма моллюсков и при соответствующих условиях окружающей среды, микроорганизмы могут вызывать инфекционные заболевания, как это было показано на примере грамотрицательных бактерий семейства *Vibrionaceae* [15]. Очевидно, что микроорганизмы, попадающие с водой, могут формировать симбиотические взаимоотношения

Таблица Показатели антилизоцимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из битинид и места их обитания (вода)

источник выделения штаммов	количество штаммов бактерий рода <i>Aeromonas</i> (n)	АЛА (мкг/мл*ОП)	БПО (OD450)
моллюски рода <i>Codiella</i>	14	$0,7 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,01$
моллюски рода <i>Bithynia</i>	26	$0,7 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,01$
вода	14	$0,5 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,02$

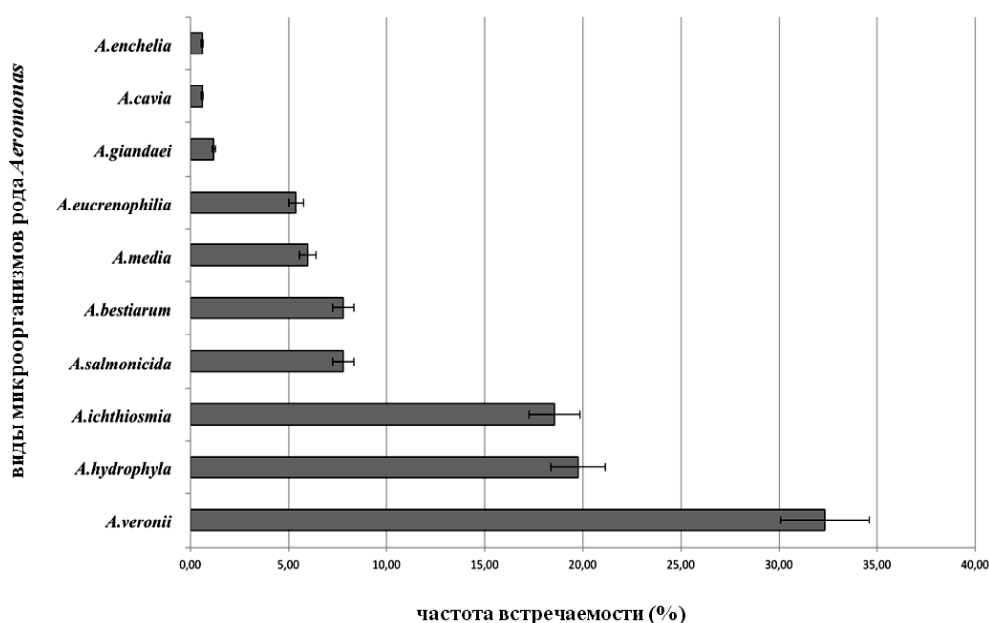


Рисунок 1. Видовая структура бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из битинид

как с микробиотой, населяющей моллюска, так и с самими битинидами. Однако, биологическая роль микроорганизмов в таких комплексах «паразит–хозяин» изучена недостаточно.

Результаты проведенных исследований показали, что бактерии рода *Aeromonas* широко представлены в микросимбиозе как моллюсков-битинид, так и в местах их обитания (вода). При определении биологических свойств микроорганизмов было установлено, что выраженность антилизоцимной активности и биопленкообразования бактерий рода *Aeromonas* варьировали в зависимости от источника выделения штаммов. При сравнении

значений антилизоцимной активности и биопленкообразования штаммов аэромонад, выделенных из моллюсков рода *Codiella* и *Bithynia* различия не были выявлены.

Таким образом, аэромонады, присутствующие в микросимбиозе моллюсков, обладают комплексом биологических свойств, в том числе таких, как способность инактивировать лизоцим и формировать биопленки, что способствует адаптации микроорганизмов к среде обитания. Полученные данные вносят вклад в расшифровку механизмов формирования, поддержания и функционирования ассоциативного микропаразитоценоза.

23.12.2014

#### Список литературы:

1. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Насибуллин И.Р., Золотухин С.Н., Нафеев А.А., Горшков И.Г., Кукина Н.Г., Барт Н.Г. Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоров на основе гомологичных бактериофагов // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 5-1. – С. 50-54.
2. Катаева Т.И. Разработка методов выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2009. – 19 с.
3. Беленева И. А., Жукова Н.В. Таксономический состав микрофлоры, ассоциированной с культивируемыми моллюсками *Crassostrea lugubris* и *Perna viridis* и с водой в лагуне залива Нячанг, Вьетнам // *Микробиология*. – 2007. – Т. 76. – № 2. – С.253-262
4. Штыкова Ю. Р. Симбионтная и ассоциированная микрофлора кишечника байкальских брюхоногих моллюсков. // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск. – 2013. – 19 с.
5. Катаева Л.В., Корпухина Н. Ф., Степанова Т. Ф., Степанова К. Б., Колотова О. Н. Микросимбиоз моллюсков рода *Codiella* как основа формирования симбиотических отношений в системе «паразит-хозяин» при описторхозе // *Мед. паразитол.* – 2014. – № 3. – С.13-17.
6. Pujalte M.J., Ortigosa M., Macián M.C., Garay E. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater // *Int. Microbiol.* – 1999. – V. 2. – № 4. – P. 259-266.
7. Šyvokienė J., Mickėnienė L. Change in the intestinal microflora of molluscs from the Neris river depending on pollution // *Acta Zoologica Lituanica*. – 2002. – V.12. – № 1. – P. 76-81.
8. Marsollier L., Severin T., Aubry J., Merritt R.W., Saint Andre J.P., et al. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – № 70. – P. 6296-6298.
9. Romanenko L. A., Uchino M., Kalinovskaya N. I., Mikhailov V. V. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities // *Microbiol. Res.* – 2008. – № 163. – P. 633-644.
10. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. – 1982. 463 с.
11. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М. Медицина. – 1999. 365 с.
12. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – № 54. – P. 49-79.
13. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН. – 2014. 260 с.
14. Овсянникова Е.В., Федорова Н. Н., Зайцев В. Ф. Моллюски как возможные индикаторы окружающей среды. // *Успехи современного естествознания*. – 2003. – № 2. – С. 14-16.
15. Потиевский Э. Г., Царева Л. А., Бурлин В. В. Инфекционные заболевания объектов марикультуры на советском Дальнем Востоке // *Мат. симп. по паразитологии и патологии морских организмов – Ленинград, 1981.* – С.81-82.

#### Сведения об авторах:

**Перунова Наталья Борисовна**, заведующий лабораторией биомониторинга

и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, доктор медицинских наук, доцент

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. (3532) 775908, e-mail: perunovanb@gmail.com

**Катаева Л.В.**, ведущий научный сотрудник Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, кандидат медицинских наук, e-mail: KataevaLV@tniikip.rosptrebnadzor.ru

**Степанова Т.Ф.**, директор Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор, e-mail: info@tniikip.rosptrebnadzor.ru

**Карпухина Н.Ф.**, младший научный сотрудник Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора 625026, г. Тюмень, ул. Республики, 147, тел. (3452) 289992

**Бухарин Олег Валерьевич**, главный научный сотрудник биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, доктор медицинских наук, академик РАН

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. (3532) 775417, 772707; e-mail: onckadri@mail.ru