

А. З. Маликова, М. Р. Шарипова, О. А. Гусев, А. Д. Сулейманова,
А. А. Тойменцева, Т. В. Ширшикова, Е. О. Михайлова,
А. М. Марданова, Е. И. Шагимарданова

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОБНЫХ СИМБИОНТОВ ЛИЧИНКИ ХИРОНОМИДЫ POLYPEDILUM VANDERPLANKI

Ключевые слова: симбионты, протеолитическая активность, криптобиоз, идентификация.

Проведены выделение и идентификация бактерий, населяющих кишечник и покровы личинки хирономиды P. vanderplanki. Показано, что выделенные микроорганизмы относятся к родам Acinetobacter и Arthrobacter. Acinetobacter sp. обладает множественной устойчивостью к антибиотикам и секретирует в культуральную жидкость белок обладающий протеолитической активностью

Keywords: symbionts, proteolytic activity, cryptobiosis, identification.

Bacteria inhabiting gut and cuticle of the chironomids larvae Polypedilum vanderplanki were isolated and identified. It was shown that isolated microorganisms belong to the group of Acinetobacter u Arthrobacter. Acinetobacter sp. possesses multiple antibiotic resistance and secret into cultural liquid proteins with proteolytic activity.

Введение

Все макроорганизмы на Земле вовлечены в постоянные и сложные взаимодействия с микроскопическими формами жизни. Эти ассоциации формируются многие миллионы лет и оказывают важное влияние на эволюцию геномов живых организмов. Такого рода взаимодействия оказывают существенное влияние на макроорганизм: они выступают в качестве метаболических партнеров, обеспечивая клетки хозяина лимитирующими питательными веществами, выполняют протекторную функцию, продуцируя токсины против патогенных микроорганизмов, кроме того, симбионты участвуют в формировании иммунного ответа хозяина и его эволюции [1]. Показано, что большинство беспозвоночных животных имеют тесные симбиотические связи с бактериями [2,3]. Африканская хирономида *P. vanderplanki* является уникальным организмом, приспособившимся к жизни в экстремальных условиях среды. Этот организм способен к погружению во временное аметаболическое состояние, что обеспечивает его выживание при полном отсутствии воды. Такое состояние «временной смерти» называется криптобиозом [4]. Способность переносить полное высыхание является широко распространённым феноменом в царстве растений: семена способны переносить многолетнее обезвоживание без существенной потери жизнеспособности. Существует ряд беспозвоночных животных, способных индуцировать криптобиоз как на определенной стадии развития (хирономида *P. vanderplanki*) так и в любой момент жизненного цикла (тихоходки, коловратки) [5-7]. Личинки хирономиды в высушенном состоянии способны храниться до 17 лет без потери потенциала к регидратации. Они могут переживать до 77 часов при -77°C и кипячение в течении 3 часов при 106°C, погружение в 98% этанол и устойчивы к радиации. Примечательно, что вид *P. vanderplanki* является единственным в роде *Polypedilum*, развившем

способность к полному высыханию (криптобиозу). Существует теория, что эволюция криптобиоза у хирономиды проходила в тесном взаимодействии с микроорганизмами, что сказалось на генетическом аппарате, как хозяина, так и симбионтов. Изучение этих взаимодействий позволит выяснить пути коэволюции живых существ и развития механизмов устойчивости к экстремальным условиям среды.

В данной работе были выделены и идентифицированы микроорганизмы, населяющие покровы тела и кишечник личинки хирономиды *P. vanderplanki* и изучена их биологическая активность.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили личинки хирономиды *P. vanderplanki* способные к регидратации после высыхания. Лабораторная линия хирономиды была основана на криптобиотических личинках, собранных в углублениях скал в Нигерии, Африке в 2000 г. Насекомые культивировались в контролируемых условиях света и темноты 13ч света и 11ч темноты при температуре 27°C. Детальная методика культивирования хирономид описана в [8]. Для культивирования выделенных штаммов использовали среду LB. Среда LB [9] (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5. Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при 590 нм. Агаризованная среда LBA включает дополнительно 2% агара. Посевным материалом служили растертые в порошок личинки хирономиды. Порошок разводили стерильной водой и высевали на чашку Петри с L-агаром. Выдерживали в термостате в течение суток до образования отдельных колоний. Устойчивость к антибиотикам определялась путем посева 20-ти часовой культуры бактерий на чашки Петри со средой LBA с антибиотиком.

В среды были добавлены по отдельности такие антибиотики, как хлорамфеникол (Cm), тетрациклин (Tet), канамицин (Km), ампициллин

(Amp), эритромицин (Erm), пенициллин (Pn) в концентрации 5 µg/ml.

Для выявления минимальной ингибирующей концентрации в среду добавляли Pn и Amp в концентрациях 20, 40, 50, 60 µg/ml. Общую протеолитическую активность определяли по наличию/отсутствию зон гидролиза на 30% молочном агаре

Идентификацию таксономического положения выделенных штаммов проводили на основе гомологии гена 16s рДНК. Матрицей для ПЦР служила геномная ДНК бактерий. Для выделения геномной ДНК использовали GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit, (Fermentas, Canada). Полимеразную цепную реакцию проводили в конечном объеме 25мкл на амплификаторе MJ Mini, Bio-Rad, США с использованием универсальных эубактериальных праймеров 27f (5'-AGR GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') and 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3') в следующих условиях 94°C – 4', 35 циклов 94°C - 45", 57°C - 45", 72°C - 1' 30", конечная элонгация 72°C - 5'.

Идентификация микроорганизмов, населяющих личинку хирономиды

Личинки африканской хирономиды *P. vanderplanki* живущие во временных водоемах в углублениях на поверхности скал способны индуцировать ангидриобиоз. Ангидриобиоз – состояние гипометаболизма возникающее в результате полной потери воды из организма. Расшифровка генома хирономиды *P. vanderplanki* привела к установлению некоторых молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе инициации и поддержания криптобиоза [10, 11]. Как и любой другой макроорганизм *P. vanderplanki* населен бактериальным сообществом. Каким образом микроорганизмы, особенно неспорообразующие, населяющие личинку хирономиды, реагируют на условия потери воды остается загадкой. Роль симбиотических бактерий для насекомого также является невыясненной. В данной работе были выделены микроорганизмы, являющиеся доминирующими видами, обитающими на личинке *P. vanderplanki*. Секвенирование гена 16s рДНК позволило отнести доминирующие виды симбионтов к родам *Acinetobacter* и *Arthrobacter*. *Acinetobacter sp.* – мелкие (1.0x1.5 мкм), капсулированные неподвижные палочки, приобретающие форму кокков при старении культуры. 18-ти часовая культура имела признаки, типичные для грамтрицательных микроорганизмов. При микроскопировании клетки акинетобактеров располагались попарно. На твердой агаризованной среде колонии демонстрировали типичную для рода *Acinetobacter* морфологию – мелкие (1-2 мм в диаметре), непигментообразующие, кремового цвета гладкие, непрозрачные.

Для определения антибиотикоустойчивости выделенного штамма *Acinetobacter sp.* колонии пересеивали на чашки, содержащие антибиотик. Рост колоний не наблюдался, если в среде

присутствовали канамицин или эритромицин, демонстрировали слабый рост на чашках, содержащих хлорамфеникол и тетрациклин и хороший рост в присутствии пенициллина и ампициллина. Для определения минимальной ингибирующей концентрации бактерии высевали на чашки, содержащие соответствующий антибиотик в различных концентрациях (табл. 1).

Таблица 1 - Рост *Acinetobacter sp.* на среде с ампициллином и пенициллином

Концентрация, µg/ml	Рост колоний	
	Pn	Amp
20	+	+
40	+	+
50	+	+/-
60	+/-	+/-
80	-	-

Бактерии *Acinetobacter sp.* проявили высокую резистентность к антибиотикам пенициллинового ряда. Однако, при концентрациях пенициллина 60 µg/ml и ампициллина 50 µg/ml наблюдалось «сползание» колоний. Этот термин употребляется в случае смещения колоний с места посева (на твердой среде). В этом случае колонии пытаются избежать контакта с антибиотиком. Таким образом, минимальная подавляющая концентрация (МПК), которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий, находится в интервале 60-80 µg/ml для каждого антибиотика. В литературе феномен резистентности представителей группы *Acinetobacter* описан достаточно хорошо. Был продемонстрирован ряд механизмов, лежащих в основе такой множественной резистентности. К ним относятся измененные пенициллин-связывающие белки, снижающаяся проницаемость наружной мембраны к антибиотикам или увеличение активного оттока антибиотиков, производством ферментов, расщепляющим антибиотики (например, β-лактамаз) [12].

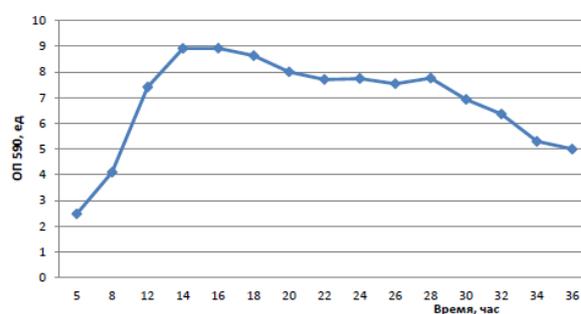


Рис. 1 - Динамика роста культуры *Acinetobacter sp.* на среде LB

Исследовали динамику роста штамма *Acinetobacter sp.* (рис. 1). Фаза экспоненциального роста культуры приходится на 8–14 часы, фаза замедления роста – 16-18 часы, к 20 часу роста культура выходит на стационар, а после 28 часа начинается ее лизис.

Для выявления внеклеточной протеолитической активности штаммы микроорганизмов высевали на 30% молочный агар (рис. 2).



Рис. 2 - Зоны гидролиза выделенных бактерий *Acinetobacter sp.* на молочном агаре

Изоляты демонстрировали высокую внеклеточную протеолитическую активность на молочном агаре. При исследовании накопления протеолитической активности в культуральной жидкости было показано, что активность фермента появляется на 5-й час роста, её уровень достигает максимума на 8 час роста, что соответствует экспоненциальной фазе роста культуры. Таким образом, установлено, что культура *Acinetobacter sp.* выделяет в культуральную жидкость одну или несколько протеиназ с максимумом активности в экспоненциальной фазе роста. Способность продуцировать внеклеточные протеиназы присуща и некоторым другим группам грамотрицательных микроорганизмов [13].

Acinetobacter sp. является одним из доминантных видов, населяющих личинку хирономиды *P. vanderplanki*. Ввиду способности к продукции внеклеточных метаболитов, в частности протеолических ферментов, можно

предположить, что эти бактерии имеют тесные метаболические связи с хозяином и, кроме того, могут выполнять протекторную функцию против других патогенных грибов и бактерий. Протеиназы, выделяемые в среду, могут служить первичной линией защиты от белковых токсинов, продуцируемых другими микроорганизмами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № 14.А18.21.0201).

Литература

1. C. Dale, N. Moran, *Cell*, **126**, 453-465 (2006).
2. S. Fraune, T.C.G. Bosch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13146-13151 (2007).
3. S. Fraune, T.C.G. Bosch, *Bioessays*, **32**, 571-580 (2010).
4. J.S. Clegg, *Comp Biochem Physiol B.*, **128**, 613-624 (2001).
5. Clegg, J.S. Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile, *Artemia* / J.S. Clegg // *Integr Comp Biol* – 2005. – P. 715-724.
6. J.H. Crowe, K.A. Madin, *T Am Microsc Soc.*, **93**, 513-524 (1974).
7. H.E. Hinton, *Proc. Zool. Soc. London*, **121**, 371-380 (1951).
8. M. Watanabe, T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukuhiro, T. Okuda, *J Exp Biol.*, **205**, 2799-2802 (2002).
9. J. Sambrook, E.F. Fritsch, S.T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.
10. R. Cornette, T. Okuda, *IUBMB Life*, **63**, 419-429 (2011).
11. Е.И. Шагимарданова, М.Р. Шарипова, И.С. Захаров, О.А. Гусев, *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, **3**, 185-189 (2012).
12. L. Poirel, R.A. Bonnin., P. Nordmann, *IUBMB Life*, **63**, 1061-1067 (2011).
13. Н.М. Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О. Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова, *Вестник Казанского технологического университета*, **16**, 191-194 (2013).

© А. З. Маликова – студ К(П)ФУ; М. Р. Шарипова - д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com; О. А. Гусев - к.б.н., каф. зоологии беспозвоночных и функциональной гистологии К(П)ФУ, ogusev@mail.ru; А. Д. Сулейманова – асп. каф. микробиологии К(П)ФУ; А. А. Тойменцева - м.н.с. той же кафедры; Т. В. Ширшикова – студ. той же кафедры; Е. О. Михайлова - доцент кафедры БСМЭ КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; А. М. Марданова – доц. каф. микробиологии К(П)ФУ; Е. И. Шагимарданова – науч. сотр. той же кафедры.