

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 ангидробиоз. Ангидробиоз - 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 грамотрицательных 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, $\mu\text{g/ml}$	Рост колоний Pn Amp
20	+
40	+
50	+
+/- 60	+/-
+/- 80	-

Бактерии *Acinetobacter* sp. проявили высокую резистентность к антибиотикам пенициллинового ряда. Однако, при концентрациях пенициллина 60 $\mu\text{g/ml}$ и ампициллина 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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.