

УДК 579.262

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ 16S МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГРУНТОВ БАТАГАЙСКОГО ПРОВАЛА

¹Журлов О.С., ²Грудинин Д.А., ²Яковлев И.Г.

¹Центр коллективного пользования научным оборудованием Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, e-mail: jurlov1968@mail.ru;

²Институт степи УрО РАН, Оренбург

Проведено исследование структуры микробиома грунтов Батагайского провала с использованием молекулярно-генетических и культуральных методов исследования. Нами показано, что основу микробиома грунтов Батагайского провала составляют три фила Proteobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes. Из проб грунта выделены психротолерантные, аэротолерантные кокки, обладающие β-гемолитической активностью и резистентные к антибактериальным препаратам (линкомицин, сульфотиазол, полимиксин В, ванкомицин, хлорамфеникол, цефуроксим).

Ключевые слова: Батагайский провал, психротолерантные бактерии, устойчивость к антибактериальным препаратам

PHYLOGENETIC 16S METAGENOMIC ANALYSIS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF PSYCHROTOLERANT BACTERIA ISOLATED FROM WATER AND SOIL BATAGAY FAILURE

¹Zhurlov O.S., ²Grudin D.A., ²Yakovlev I.G.

¹Center the scientific equipment of Institute Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of Russian Academy Sciences, Orenburg, e-mail: jurlov1968@mail.ru;

²Steppe Institute Ural Branch of Russian Academy Sciences, Orenburg

The investigation of the structure of the soil microbiota Batagay failure using molecular genetic and cultural methods. We have shown, that the basis of soil microbiota Batagay failure consists of three phylum Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes. From soil samples were isolated psychrotolerant, aerotolerant cocci having β-hemolytic activity and resistance to antibiotics (lincomycin, sulfotiazol, polymyxin B, vancomycin, chloramphenicol, cefuroxime).

Keywords: Batagay failure, psychrotolerant bacteria, resistant to antibiotics

Изменение климата на севере Янского плоскогорья приводит к термоденудации криолитозоны (таянию ископаемого льда, образованию термоэрозий, термокастровых образований), что способствует формированию разрезов криолитозоны Янского плоскогорья [3].

Одним из примеров влияния на криолитозону процессов терморазрушения является Батагайский провал, расположенный в северо-восточной части республики Саха (Якутия), в 10 км к юго-востоку от пос. Батагай (67°34' с.ш.; 134°46' в.д.) Верхоянского района в пределах природной подзоны северотаежных лиственничных лесов.

Образование Батагайского провала привело к уникальному явлению, появлению прогретых стен лёсса, с обнажением более глубоких слоев вечной мерзлоты (высота обнажения Батагайского провала около 60 метров). Дно провала осложнено гребневыми грядами-останцами, сложенными из перетолоченных в результате термоэрозии лессовидных пород. Формирующиеся на грядах, лишенных мерзлоты, травянистые сообщества, резко отличаются от про-

израстающей растительности ландшафтов подзоны северотаежных лиственничных лесов, в пределах которой находится Батагайский провал.

В августе-сентябре 2014 года была организована научная экспедиция сотрудников Института степи УрО РАН в район Батагайского провала, с отбором проб воды и грунтов лёсса, для проведения химического и микробиологического анализа.

Использование методов молекулярно-генетического анализа, в сочетании с методами культивирования бактерий на искусственных питательных средах, позволяет достаточно полно охарактеризовать биологическое разнообразие микроорганизмов, содержащихся в слоях вечной мерзлоты [6, 7, 8] и в палеобразцах ископаемых животных [9].

В связи с этим, целью исследования явилось определение качественного состава почвенного микробиома грунтов Батагайского провала, выделение культур психротолерантных, аэротолерантных бактерий и исследование их морфо-физиологических свойств и устойчивости к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы исследования

Штаммы и условия культивирования. Образцы воды, в количестве 100 мкл, с пленкой вытаявшей органики и без органики заливали 2 мл жидкой питательной среды и оставляли для роста в холодильнике при +4°C, при периодическом шутелировании. Пробы воды из ручья Батагайского провала, в объеме 300 мл, и 48 часовые культуры, в объеме 100 мл, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм ("Millipore", США). Фильтры оставляли в холодильнике при -20°C, до проведения 16S метагеномного анализа.

Для культивирования бактерий использовали жидкую и плотную питательные среды (НПО «Питательные среды», г. Махачкала).

Высевы, на твердую питательную среду, из жидкой питательной среды делали сразу, и на первые, на вторые, и на девятые сутки. Морфологические, тинкториальные и физиологические свойства бактерий оценивали с помощью микроскопических и бактериологических методов исследования. Морфологию колоний бактерий оценивали по форме, размеру и пигментообразованию.

Определение антибиотикорезистентности. Резистентность к антибактериальным препаратам, для всех включенных в исследование чистых культур бактерий, была определена в соответствии с рекомендациями (NCCLS) [4]. Бактериальный инокулят был получен путем суспендирования бактерий в стерильном 0,15 М NaCl, который доводили до 0,5 OD по стандарту McFarland. Устойчивость к антибиотикам тестировали с помощью диско-диффузионной пробы на агаре Мюллера-Хинтона в следующих концентрациях: гентамицин 10 мкг, хлорамфеникол 30 мкг, ванкомицин 30 мкг, канамицин 30 мкг, цефуроксим 30 мкг, полимиксин В 300 ед., неомицин 30 мкг, линкомицин 15 мкг, сульфатиазол 10 мкг. Диаметр зон и приравненных к ним минимальные ингибирующие концентрации (МИК), оценивались в соответствии со стандартами определения антибиотикорезистентности [4].

Филогенетический 16S метагеномный анализ. Геномную ДНК выделяли по оригинальной методике [1]. Секвенирование (NGS) проводили на секвенаторе MiSeq System (Illumina, США). Анализ и обработку данных осуществляли в программе USEARCH v8.0.1623_win32.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного 16S метагеномного анализа проб грунта Батагайского провала, было показано, что основу микробиома составляют три мажорных фила – Proteobacteria – 65.96%, Bacteroidetes – 9.25% и Firmicutes – 6.08% и четыре минорных – Verrucomicrobia – 2.77%, Nitrospirae – 1.72%, Planctomycetes – 1.52%, Chlamydiae – 1.68% всех ридов. Метагеномный анализ воды, из ручья Батагайского провала, дополнительно выявил еще два фила (Actinobacteria – 3.1% и Tenericutes – 3.11%).

Семейства бактерий, входящих в микробиом грунтов Батагайского провала, были представлено такими таксонами, как –

Rhodocyclaceae – 17.12%, Rhodospirillaceae – 7.2%, Hyphomicrobiaceae – 4.91%, Legionellaceae – 4.14%, Sphingobacteriaceae – 2.64%, Chitinophagaceae – 2.51%, Thermoanaerobacteraceae – 2.35% всех ридов. Качественный состав семейств бактерий, полученный в результате 16S метагеномного анализа воды, несмотря на схожесть представительства некоторых семейств, отличался (Rhabdochlamydiaceae – 12.75%, Hyphomicrobiaceae – 5.93%, Comamonadaceae – 5.93%, Bacillaceae – 4.74%, Phyllobacteriaceae – 2.94%, Legionellaceae – 2.72%, Rhodocyclaceae – 2.66% ридов).

С помощью метагеномного анализа удалось идентифицировать микроорганизмы, входящие в состав грунтов Батагайского провала (*Legionella rowbothamii* – 2.53%, *Thermoanaerobacter inferii* – 1.81%, *Rhodothermus clarus* – 1.63%, *Candidatus Rhabdochlamydia crassificans* – 1.44%, *Desulfonatronum thiosulfatophilum* – 1.38%, *Pedobacter koreensis* – 1.20%, *Oleomonas sagaranensis* – 1.17% всех ридов) и воды (*Candidatus Rhabdochlamydia* – 12.51%, *Legionella rowbothamii* – 2.71%, *Phyllobacterium catacumbae* – 2.66%, *Desulfonatronum thiosulfatophilum* – 2.21%, *Arthrospira fusiformis* – 1.09% всех ридов).

На следующем этапе исследования, используя методику накопительных культур, через 48 часов культивирования (+4°C) из образца грунта лёсса нами были выделены бактерии, формирующие при росте на твердой питательной среде, 4 типа колоний: темно-оранжевые; белые-матовые; бледно-белого и желтого цвета. Общее содержание бактерий (КОЕ) выделенных из 1 грамма грунта лёсса (разных образцов) составило от 2×10^2 до $3,5 \times 10^3$ КОЕ.

Всем психротолерантным (выросшим при температуре +4°C) бактериям, была дана характеристика их морфо-физиологических свойств, гемолитической активности и устойчивости к антибактериальным препаратам (таблица).

Из образцов воды не удалось выделить бактерии, при используемой методике выделения, ни через 24 часа, 48 часов и 9 дней культивирования.

Обсуждение. Результаты исследования свидетельствуют о том, что бактериальное сообщество грунтов Батагайского провала гетерогенно по составу. Наряду с доминирующими филами (Proteobacteria – 65.96%, Bacteroidetes – 9.25% и Firmicutes – 6.08%), характерными для засоленных почв, в состав микробиома входят несколько минорных фил.

Особенностью микробного сообщества грунтов является, то, что три семейства (Legionellaceae, Rhodocyclaceae,

Nyphomicrobiaceae) встречаются в пробах грунтов и воды, как и три идентифицированных вида бактерий (*Legionella rowbothamii*, *Desulfonatronum thiosulfatophilum*, *Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*), что свидетельствует о доминировании этих таксонов в составе микробиома грунтов Батагайского провала.

Выделение кокковой флоры, обладающей гемолитической активностью и резистентностью к антибактериальным препаратам, свидетельствует о возможной антропогенной контаминации воды и грунта или принесенных ветром частицами грунта бактерий, представителей почвенного микробиома сервотаежных листовенных лесов.

Однако, проявляемая некоторыми выделенными культурами бактерий гемолитиче-

ская активность (при +35°C), способность расти в широком диапазоне температур (от +4°C до +35°C), свидетельствует о высоком адаптивном потенциале психротолерантных бактерий и экологической пластичности их геномов, что может способствовать экспрессии факторов патогенности [5]. Ранее нами было показано, что адаптация к суб- и супраоптимальной температуре культивирования приводит к изменению морфо-физиологических и физико-химических свойств бактерий [2].

Применяя молекулярно-генетические и культуральные методы исследования мы лишь приподняли завесу качественного состава бактерий, контаминирующих оттаивающую органику и грунты Батагайского провала.

Морфо-физиологические свойства и антибиотикорезистентность аэротолерантных, психротолерантных бактерий, выделенных из грунта лёсса Батагайского провала

Характеристики штамма	Штамм S4T4c1	Штамм S4T4c2	Штамм S5T22c2-48	Штамм S5T22c3-48
Окраска по Граму	Грамположительные кокки (окраска вариабельна), одиночно расположены	Грамположительные кокки, одиночно расположены	Грамотрицательные кокки, одиночно расположены	Грамотрицательные кокки, одиночно расположены
Температура роста	+4°C до +35°C, оптимальная температура культивирования – 22°C	+4°C до +35°C	+4°C до +35°C	+4°C до +35°C
Рост на средах	Растут на средах содержащих 10% NaCl. При росте на желточно-солевом агаре проявляют лецитовитилазную активность. Не растут на среде Эндо	Растут на простых средах. Не растут на средах содержащих 10% NaCl. Не растут на среде Эндо	Растут на простых средах и средах содержащих 10% NaCl. Не растут на среде Эндо	Растут на простых средах. Не растут на средах содержащих 10% NaCl. Не растут на среде Эндо
Характеристика колоний	Крупные колонии с неровными краями, темно-оранжевого цвета, растут над поверхностью агара, диаметр 3-4 мм	Крупные колонии, округлые, края ровные, бледно-белого цвета, растут над поверхностью агара, диаметр 3-4 мм	Мелкие колонии с неровными краями, желтого цвета, растут над поверхностью агара, в диаметре 1-2 мм	Мелкие колонии с неровными краями, белого цвета, растут над поверхностью агара, диаметр 1-2 мм
Гемолитическая активность	При росте на кровяном агаре (+35°C; 18 часов) образуют зону β-гемолиза (d=21 мм)	Не обладает гемолитической активностью	Обладают гемолитической активностью (β-гемолиз, d=8 мм), при температуре +35°C	Не обладают гемолитической активностью
Резистентность к антибактериальным препаратам	Полимиксин В, линкомицин	Линкомицин, ванкомицин, сульфотиазол, хлорамфеникол, цефуроксим	Линкомицин, сульфотиазол	Линкомицин, сульфотиазол
Чувствительность к антибактериальным препаратам	Гентамицин, левомицетин, ванкомицин, канамицин, цефуроксим, неомицин, сульфотиазол, хлорамфеникол	Гентамицин, левомицетин, канамицин, неомицин, полимиксин В	Гентамицин, левомицетин, канамицин, ванкомицин, неомицин, полимиксин В, цефуроксим, хлорамфеникол	Гентамицин, левомицетин, канамицин, ванкомицин, неомицин, полимиксин В, цефуроксим, хлорамфеникол

Список литературы

1. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Выделение ДНК из образцов почвы (методические указания). – СПб: ВНИИСХМ РАСХН, 2011. – 27 с.
2. Журлов О.С., Гриценко В.А., Брудастов Ю.А. Влияние температуры культивирования на физиологические и физико-химические свойства *Escherichia coli* K12 // Вестник ОГУ. – 2009. – №12. – С.106-110.
3. Куницкий В.В., Сыромятников Л. и др. Ледяные породы и термоденудация в районе поселка Багагай (Янское плоскогорье, Восточная Сибирь) // Криосфера Земли. – 2013. – № 1. – С.56–68.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. CLSI Document M100-S17. January. – 2007.
5. Dziewit L., Bartosik D. Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol.5. – Art. 596.
6. Gilichinsky D., Rivkina E., Shcherbakova V. et al. Supercooled water brines within permafrost—an unknown ecological niche for microorganisms: a model for Astrobiology // *Astrobiology.* – 2003. – Vol. 3. – P.331-341.
7. Kondakova A.N., Novototskaya-Vlasova K.A., Drutskaya M.S. et al. Structure of the O-polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Psychrobacter muricolla* 2pST isolated from overcooled water brines within permafrost // *Carbohydrate research.* – 2012. – Vol. 349. – P.78-81.
8. Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E. et al. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – Vol.60. – P.455-459.
9. Mardanov A.V., Bulygina E.S., Nedoluzhko A.V. et al. Molecular analysis of the intestinal microbiome composition of mammoth and woolly rhinoceros // *Doklady biochemistry and biophysics.* – 2012. – Vol.445. – P.203-206.