

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ХАРАКТЕРИСТИКА УЛЬТРАМЕЛКИХ БАКТЕРИЙ РОДА
CHRYSEOBACTERIUM FM1 И FM2, ВЫДЕЛЕННЫХ С КОЖНЫХ
ПОКРОВОВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *XENOPUS LAEVIS*

© 2019 г. Д. В. Росс^а, Н. Е. Сузина^а, А. Б. Гафаров^а, А. В. Мачулин^а,
Т. З. Есикова^а, А. П. Шорохова^а, В. И. Дуда^{а, *}, А. М. Боронин^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: duda@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 25.09.2018 г.

После доработки 30.10.2018 г.

Принята к публикации 30.11.2018 г.

С поверхности кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* выделены и описаны два штамма ультрамелких грамотрицательных бактерий (УГОБ) – FM1 и FM2. Изучены цитологические, физиолого-биохимические и генотипические характеристики полученных изолятов. На основании данных о нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и фенотипических свойств изученные штаммы отнесены к роду грамотрицательных бактерий *Chryseobacterium*. Клетки выделенных штаммов характеризуются ультрамелкими размерами: объем их клеток в развивающихся культурах составляет ~0.06 мкм³ для штамма FM1 и ~0.015 мкм³ для штамма FM2. Клетки изученных УГОБ прочно прикреплены к поверхности кожи лягушек и не удаляются при многократной промывке водой, что позволяет отнести эти бактерии к эпibiонтам. Прочности связывания УГОБ с кожей лягушек, по-видимому, способствуют адгезивные свойства фимбриоподобных отростков, обнаруженных у клеток штаммов FM1 и FM2 с помощью электронной микроскопии. Локализация ультрамелких грамотрицательных бактерий позволяет заключить, что на поверхности кожи лягушек они могут являться своеобразным защитным бактериальным фильтром, а поверхность кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки *X. laevis* впервые характеризуется как специфическое местообитание некоторых ультрамелких хризеобактерий. Выделение и описание двух новых ультрамелких хризеобактерий – штаммов FM1 и FM2, расширяет сведения о разнообразии структурно-функциональных свойств клеток и экониш обитания бактерий рода *Chryseobacterium*.

Ключевые слова: ультрамикробактерии, ультрамелкие симбиотические бактерии, хризеобактерии, эпibiонты амфибий, электронная микроскопия микроорганизмов

DOI: 10.1134/S0026365619020101

Симбиотические микроорганизмы – эпibiонты кожи лягушки, активно исследуются на протяжении последних десятилетий. В настоящее время известно, что слизистые покровы земноводных населены бактериями-представителями нескольких десятков родов, таких как *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Pseudoclavibacter*, *Rhodococcus* и других (Bevins, Zasloff, 1990; Bulet et al., 2004; Belden, Harris, 2007; Brucker et al., 2008; Becker, Harris, 2010; Conlon, 2011; Bell et al., 2013; Antwis et al., 2014). Данные ряда исследователей свидетельствуют о том, что роль симбиотических микроорганизмов можно в целом охарактеризовать как защитную. Микроорганизмы могут продуцировать вещества с антимикробной активностью, конкурировать за субстрат с болезнетворными микроорганизмами, изменять микроокружение поверхностных покровов хозяйского организма,

предотвращая колонизацию покровов микроорганизмами из окружающей среды, либо стимулировать секрецию защитных пептидов кожными железами лягушек (Zasloff, 1987; Zairi et al., 2009; Conlon et al., 2012; King et al., 2012; Clay, 2014). Секрет кожных желез амфибий содержит (часто в высоких концентрациях) значительное количество биологически активных веществ. В его состав входят соединения с антимикробной и противовирусной активностью, представленные по большей части короткими пептидами, такими как мегаинины, пептид глицин-лейцин-амид (PGLa), фрагмент-предшественник церулеина (CPF) и фрагмент-предшественник ксенопсина (XPF) (Conlon et al., 2012; King et al., 2012; Clay, 2014). Таким образом, химический состав слизистых покровов делает кожную поверхность амфибий неблаго-



Рис. 1. Африканская гладкая шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*.

приятной средой обитания для многих болезнетворных микроорганизмов.

Морфология изученных в настоящее время бактерий-симбионтов разнообразна, в основном, они представлены грамотрицательными и грамположительными бактериями с обычными размерами клеток. При этом данные по выделению и характеристике ультрамелких форм симбиотических бактерий эукариотных земноводных организмов в литературе отсутствуют. С поверхности кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* нами были выделены два штамма грамотрицательных бактерий FM1 и FM2. В настоящей работе приводятся данные об их свойствах и результаты анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Выделение и характеристика новых штаммов микроорганизмов-эпibiонтов земноводных позволит расширить представление о видовом разнообразии бактерий, населяющих экстремальные природные биотопы.

Целью настоящей работы было изучить цитологические, физиолого-биохимические и генотипические свойства изолятов FM1 и FM2, выделенных с кожных покровов лягушки *X. laevis*, а также провести сравнительный анализ штаммов FM1 и FM2 между собой и с ранее выделенными ультрамелкими бактериями из рода *Chryseobacterium*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение бактериальных культур и условия их инкубирования. Источником для выделения бактериальных культур были слизистые слои кожных покровов африканской гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (рис. 1).

Образцы слизистых покровов лягушки отбирали соскобом после предварительного ополаскивания животного в стерильной водопроводной воде для удаления бактерий-контаминантов из окружающей среды. Полученный материал слизистых покровов переносили в 2 мл фосфатного буфера (г/л: NaH_2PO_4 – 6.0; Na_2HPO_4 – 22.0; рН 6.9), ресуспендировали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0.4 мкм, и аликвоты суспензии (100 мкл) высевали на специально разработанную агаризованную среду АQ. Среду готовили на основе аквариумной воды, в которой развивались лягушки, и измельченных водорослей *Lemna minor* и *Ceratophyllum submersum* (200.0 г/л), служивших источником углерода, азота и микроэлементов. Накопительные и чистые культуры выделяли с использованием питательных сред: (а) разработанной в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов РАН триптон-соевой среды 5/5 следующего состава (г/л): экстракт сои – 30.0, гидролизат казеина – 5.0, дрожжевой экстракт – 1.0 и аминокислота (мл/л) – 60.0, рН 8.0; агаризованной (20 г/л) среды того же состава; (б) питательного агара ВВL (“Difco”); (в) среды Лурия–Бертани (LB); (г) среду М-9 (г/л): NaH_2PO_4 – 6.0; KH_2PO_4 – 3.0; NaCl – 0.5; NH_4Cl – 1.0; MgSO_4 – 0.25; CaCl_2 – 0.01; агар – 20. Чистоту выделенных культур контролировали с помощью световой фазово-контрастной и трансмиссионной электронной микроскопии, а также путем рассева изолятов на агаризованную среду АQ и выявления в посевах посторонних, не свойственных выделенным штаммам, колоний. Полученные изоляты культивировали в жидкой триптон-соевой питательной среде 5/5.

Определение физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов. Для определения условий оптимального роста бактерий использовали жидкую полноценную среду 5/5. Температурный оптимум роста определяли в диапазоне 4–42°C, влияние рН на рост культур оценивали в интервале рН 4.0–11.0. Изменения рН среды осуществляли добавлением 3 М NaOH или 1 М HCl. Галотолерантность изолятов определяли при выращивании культур в средах с содержанием NaCl от 0 до 10%. Интенсивность роста культур оценивали по их оптической плотности, определяемой при длине волны 590 нм, толщине кюветы 5 мм в спектрофотометре UV Specord (“Carl Zeiss”, Германия). Все варианты опыта выполняли в 3-х повторностях. Спектры утилизируемых субстратов и биохимические свойства изолятов определяли с использованием тестов API 32E и 50CH (“bioMerieux”,

Франция) и цветных сред Гисса с углеводами (г/л: пептон — 10, NaCl — 5, углевод — 7, индикатор бромтимоловый синий — 1 мл 1.6% раствора).

Для определения антибиотикорезистентности выделенных бактерий антибиотик в определенной концентрации вносили в теплую агаризованную (2%) триптон-соевую питательную среду 5/5 и разливали в чашки Петри. После застывания среды, культуры рассеивали штрихом и инкубировали в течение 2–3 сут при температуре 28°C. По наличию или отсутствию роста культур судили о действии антибиотиков на них. Концентрации антибиотиков указаны в табл. 2.

Физиолого-биохимические свойства изолятов изучали общепринятыми методами, учитывая минимальный перечень стандартных признаков, рекомендованных для описания новых таксонов семейства *Flavobacteriaceae* (Bernardet et al., 2002).

Антагонистическую активность штаммов FM1 и FM2 оценивали луночно-диффузионным методом. Для этого 15 мкл суточной культуры вносили в лунки, внеклеточным метаболитам давали диффундировать в агар и сверху заливали полужидким питательным агаром (0.7%), содержащим $5-7 \times 10^7$ кл./мл тест-культуры. Чашки инкубировали при температуре 24°C в течение 72 ч. Антагонистическую активность оценивали визуально по наличию и величине зон угнетения роста тест-культур вокруг лунок каждые 24 ч. В качестве тест-культур использовали грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* K12, *Erwinia amylovora* B34, *Alcaligenes rucklandii* B 1333, *Pseudomonas putida* KT2442, *P. aeruginosa* PAO1, *P. caryophyllii* ВКМВ129 и грамположительные бактерии: *Micrococcus luteus* B 1819, *Microbacterium* sp. S3, *Bacillus sphaericus* B506–2, *B. weihenstephanensis* КВАВ4, *Arthrobacter* sp. BS2.

Определение морфологических признаков и ультраструктурной организации клеток изолированных штаммов бактерий. Световая фазово-контрастная микроскопия. Микроскопические наблюдения проводили с использованием микроскопов Nikon Eclipse Ci microscope (“Nikon”, Япония) с камерой ProgRes SpeedXT (“Jenoptic”, Германия).

Просвечивающая электронная микроскопия. Для приготовления ультратонких срезов клетки концентрировали центрифугированием (10000 g, 15 мин) и фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 1 ч при 4°C. Затем материал трижды отмывали в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) и дополнительно фиксировали 2%-ным раствором OsO₄ в том же буфере в течение 4 ч при 18–20°C. После обезвоживания в этаноле возрастающей концентрации (с 30 до 100% в течение 20 мин на каждом этапе) и абсолютном 100% ацетоне, материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Для приготовления ультратонких срезов фраг-

ментов поверхностного слоя эпидермиса осуществляли аналогичную процедуру фиксации, обезвоживания и заключения в эпоксидную смолу без процедуры центрифугирования материала. Срезы монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата в 70% спирте и дополнительно контрастировали цитратом свинца (Reynolds, 1963).

Ультратонкие срезы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия. В качестве материала для сканирующей электронной микроскопии использовали фрагменты поверхностного слоя эпидермиса, взятые сразу после линьки животного. Перед фиксацией в глутаровом альдегиде образцы очищали от микроорганизмов-контаминантов окружающей среды путем промывки в нескольких сменах стерильной водопроводной воды. Образцы фиксировали в 1.5% растворе глутарового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч, затем трижды отмывали в том же буфере и дополнительно фиксировали в 1% растворе OsO₄ в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания в серии этанола возрастающей концентрации (с 30 до 100% в течение 20 мин на каждом этапе) клетки дополнительно пропитывали в *tert*-бутиловом спирте (*tert*-butanol, “SIGMA-ALDRICH”) в двух сменах по 20 мин при 26°C. Далее образцы замораживали в *tert*-бутиловом спирте и проводили процедуру замораживания–высушивания в установке JFD-320 (“JEOL”, Япония) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. На поверхность высушенных образцов наносили золото в напылительной установке JFC 1100 (“JEOL”, Япония). Электронно-микроскопический анализ проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (“JEOL”, Япония).

Расчет объемов клеток проводили по данным морфометрического анализа электронно-микроскопических изображений негативно окрашенных 0.3% водным раствором уранилацетата или тотальных препаратов бактерий. При расчетах объемов клеток считали, что они имеют форму шара или эллипсоида вращения. Для расчетов использовали формулу:

$$V = \frac{1}{6} \pi l d^2,$$

где l — длина клетки, d — диаметр клетки.

Методы молекулярной систематики. Выделение и очистку ДНК проводили методом Мармура (Marmur, 1961). Мол. % ГЦ-пар в ДНК определяли методом тепловой денатурации, используя ДНК *E. coli* K12 в качестве стандарта.

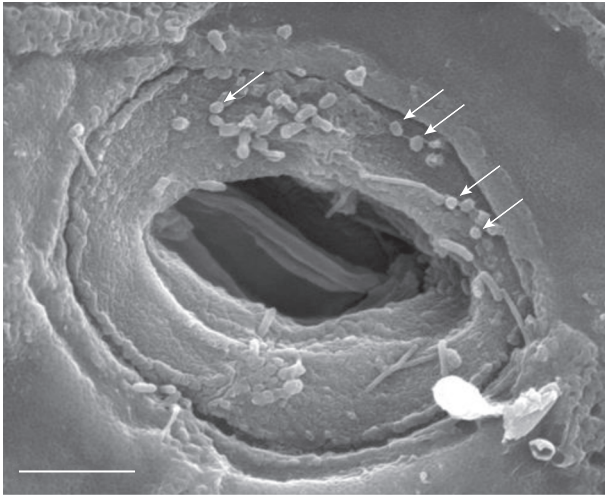


Рис. 2. Фрагмент поверхности кожи лягушки. Видна пора железы и локализованные вокруг нее палочковидные и кокковидные клетки бактерий. Стрелками указаны ультрамелкие кокковидные бактериальные клетки. Сканирующая электронная микроскопия. Масштабная метка — 5 мкм.

ПЦР-амплификацию фрагментов генов 16S рРНК бактерий (~1200 п.н.) проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f и 1525r. ПЦР проводили на амплификаторе Gen Amp PCR System 9700 (“Applied Biosystems”, США). Проверку продуктов ПЦР осуществляли путем их электрофореза в 1% агарозном геле с последующей визуализацией продуктов реакции с помощью УФ-трансиллюминатора. Секвенирование нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагмента, очищенного с помощью набора реактивов QIAEX II Gel Extraction Kit (“QIAGEN”, США) согласно рекомендациям производителя, осуществляли на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Использовали принцип автоматического секвенирования ДНК (по Сэнгеру) с последующим капиллярным гель-электрофорезом и детекцией терминированных продуктов секвенирующих реакций в режиме реального времени. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программного пакета BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей производили с использованием программы MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). Филогенетический анализ проводили методом “ближайших соседей” (neighbor-joining), используя реализованные в пакете программ MEGA6 алгоритмы.

Для получения геномых рестрикционных профилей (Nector, Johnson, 1990) использовали нативную хромосомную ДНК, иммобилизованную в агарозе. ДНК выделяли согласно протоколу

FIGE Mapper. Instruction Manual and Application Guide (“BioRad”, США). Рестрикцию нативной хромосомной ДНК осуществляли с помощью набора 20 ферментов (“Fermentas”, США), узнающих последовательность из 6 или 8 пар нуклеотидов, согласно рекомендациям производителя. Из этого набора ферментов были отобраны четыре — *NheI*, *SpeI*, *SgsI* и *NotI*, дающие оптимальное для анализа количество рестрикционных фрагментов. Размеры небольших фрагментов ДНК (от 5 до 150 т.п.н.) определяли с помощью инверсионного электрофореза (FIGE Mapper, “BioRad”, США). Электрофорез проводили согласно рекомендациям производителя по программе № 8. Фрагменты большого размера определяли с помощью пульс-электрофореза (Pulsaphor System, “Pharmical LKB”) который проводили по программе: время — 24 ч, напряжение — 180 В, пульсы — 30–70 с, температура — 14°C. В качестве стандартов размеров фрагментов использовали CHEF DNA Size Standart, Lambda Ladder (“Bio-Rad”, США). Размеры рестрикционных фрагментов генома определяли относительно размеров конкатемеров стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наблюдения *in situ*. Изучение поверхности кожи африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis in situ* с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии показало, что на поверхности локализуются разнообразные по морфологии бактерии (рис. 1, 2), преимущественно представленные грамтрицательными палочками (0.3–0.7 × 0.2–0.4 мкм) и кокками (0.3–0.5 мкм в диаметре). Бактерии заселяют поверхность кожи очагами, их средняя плотность составляет приблизительно 1200 клеток на 1000 мкм², наибольшее их скопление можно наблюдать в области пор кожных желез (рис. 2, 3, 5).

Выявленные в трансмиссионном и сканирующем электронных микроскопах на поверхности кожи ультрамелкие клетки многочисленных грамтрицательных бактерий имеют значительное сходство по ультраструктуре и морфометрическим показателям с представителями рода *Chryseobacterium* (Vandamme et al., 1994; Сузина и соавт., 2011; Сузина и соавт., 2015) (рис. 2, 3). Как видно на ультратонких срезах, в связи этих клеток с поверхностью кожи участвуют капсулярные фибриллы (рис. 3а–3в).

Выделение штаммов. Образцы секрета кожных желез лягушки получали путем стерильного отбора слизи с дорзального участка кожи животного после его отмывки в нескольких сменах стерильной воды с целью удаления бактерий-контаминантов из окружающей среды. Из взятых образцов слизи методом накопительных культур было выделено 15 бактериальных штаммов, характери-

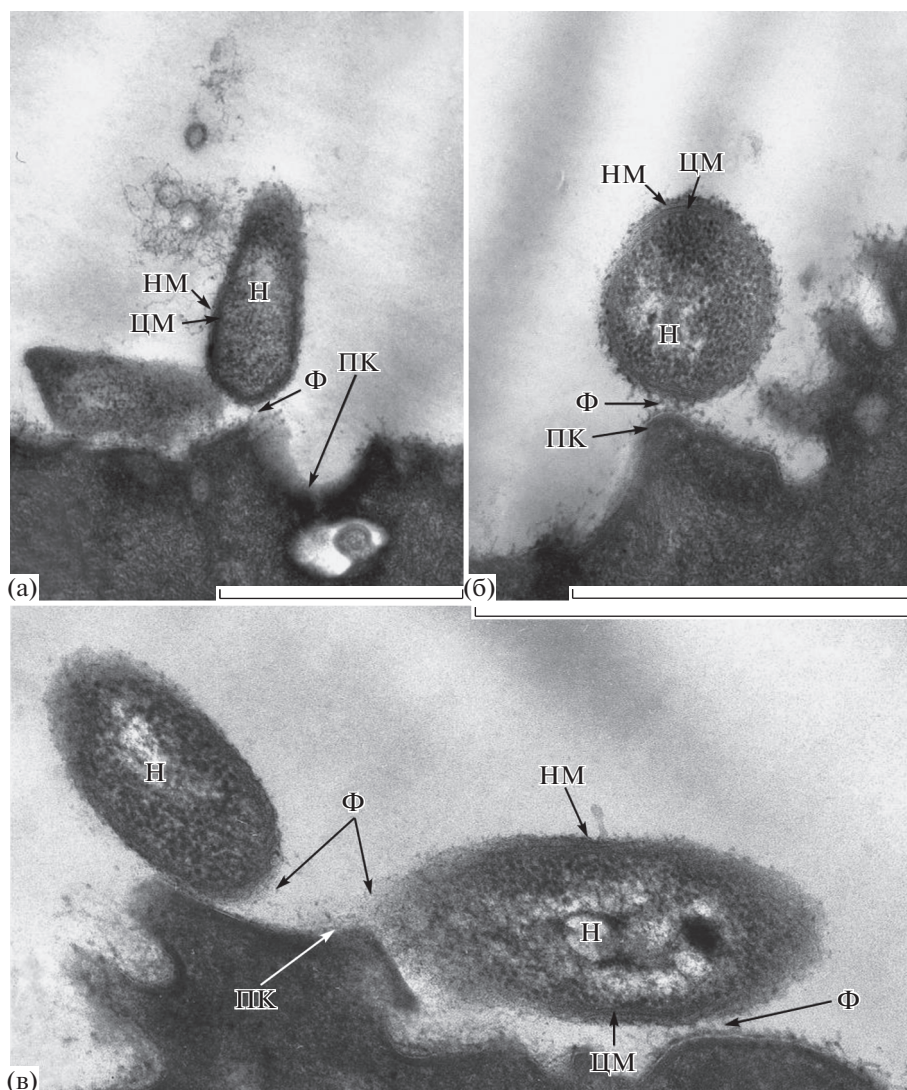


Рис. 3. (а–в) – ультратонкие срезы фрагментов поверхности кожи лягушки (ПК) с прикрепленными к ней бактериальными клетками. Просвечивающая электронная микроскопия. Обозначения: Ф – фибриллы бактериальных капсул, Н – нуклеоид, НМ – наружная мембрана, ЦМ – цитоплазматическая мембрана. Масштабная метка – 1 мкм.

зовавшихся ультрамелкими размерами клеток при росте на среде АQ. Из них два штамма – FM1 и FM2, были отобраны для детальных исследований, поскольку средний размер их клеток не превышал 0.1 мкм^3 при росте на всех использованных средах. Кроме того, клетки этих штаммов морфологически были наиболее сходными с клетками, выявляемыми *in situ* на поверхности кожи с помощью электронно-микроскопического анализа. Выделение чистых культур проводили на среде АQ с последующим пересевом на среды 5/5 и LB. При замене среды 5/5 на LB наблюдалось увеличение объема клеток в среднем на 0.02 мкм^3 . Два других штамма, использованных в сравнительных исследованиях, были выделены нами ранее и охарактеризованы как ультрамелкие бактерии из рода *Chryseobacterium* (Сузина и соавт., 2011).

Размеры и ультраструктура клеток. Средний размер клеток полученных изолятов составил $0.7 \times 0.35 \text{ мкм}$ для FM1 и $0.5 \times 0.2 \text{ мкм}$ для FM2. Средний объем клеток $\sim 0.06 \text{ мкм}^3$ для штамма FM1 и $\sim 0.015 \text{ мкм}^3$ для штамма FM2.

Для обоих исследуемых штаммов характерным свойством являлось формирование в развивающейся культуре мелких и ультрамелких жизнеспособных клеток в экспоненциальной фазе роста культуры (рис. 4). Палочковидные клетки, имеющие длину от 0.3 до 0.8 мкм и объем $< 0.1 \text{ мкм}^3$, встречались в лаг-фазе и начале логарифмической фазы роста у обоих исследуемых штаммов. В экспоненциальной фазе роста они начинали активно размножаться в результате дробления и/или бинарного деления (рис. 4).

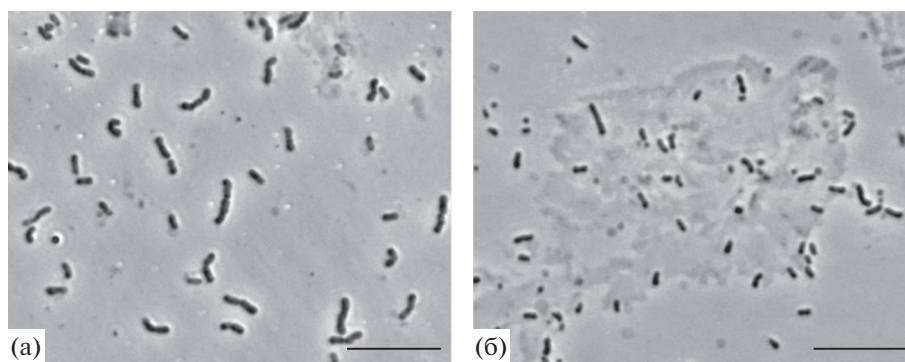


Рис. 4. Вид клеток штаммов FM1 (а) и FM2 (б) культур, растущих в жидкой питательной среде 5/5 (при 28°C). Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная метка – 10 мкм.

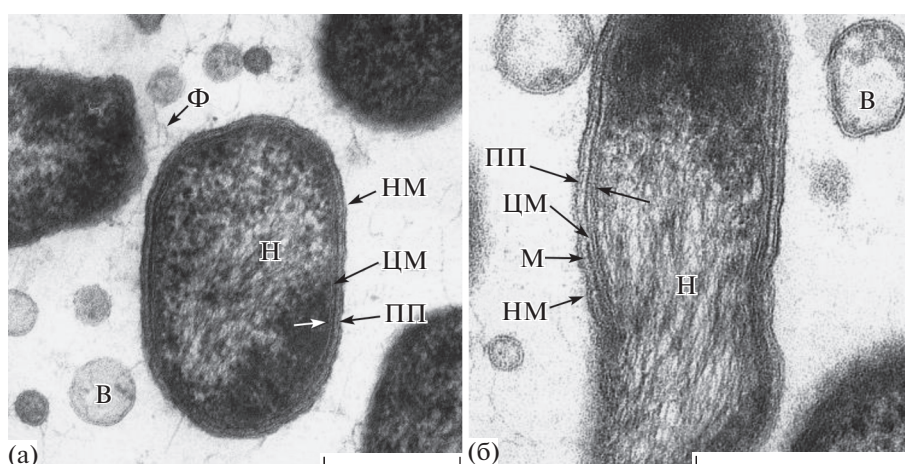


Рис. 5. Ультратонкие срезы клеток штаммов FM1 (а) и FM2 (б). Видно, что клетки обладают оболочкой, типичной по строению с грамотрицательными бактериями. Обозначения: НМ – наружная мембрана, М – муреин, ЦМ – цитоплазматическая мембрана, ПП – периплазматическое пространство, Н – нуклеоид, Ф – экстрацеллюлярные фибриллы, В – внеклеточные мембранные везикулы. Масштабная метка – 0.3 мкм.

Клетки штаммов FM1 и FM2 характеризовались типичным для грамотрицательных бактерий строением оболочки, в состав которой входят наружная мембрана, периплазматическое пространство, слой муреина и цитоплазматическая мембрана (рис. 5). Сравнительный морфометрический анализ ультратонких срезов клеток исследуемых штаммов показал, что они имеют слой муреина толщиной от 8 до 12 нм. Их клетки неподвижны и не обладают способностью к скольжению. Кроме того, для них характерно отсутствие многих внутриклеточных органелл, известных для “обычных” прокариот, и включений резервных веществ. Сравнительный анализ ультратонких срезов показал наличие у клеток исследуемых штаммов обширной фибриллярной сети в виде тонких протяженных разветвленных фибрилл, ассоциированных с внешней поверхностью наружной мембраны клеток и ориентированных в межклеточное пространство (рис. 5).

Характерным свойством изученных штаммов было присутствие на клетках и в межклеточном пространстве крупных электронно-прозрачных сферических мембранных везикул с гетерогенным содержимым, выявляемым на всех фазах роста культур, развивающихся на питательных средах различного состава (рис. 5). Часть из них, вероятно, являются “пустыми” и не несут какого-либо содержимого, но большая часть везикул заполнена веществом гранулярно-фибриллярной природы. Мембранные везикулы для каждого штамма различаются между собой по диаметру и плотности упаковки их содержимого. Диаметр везикул может варьировать в диапазоне от 80 до 100 нм у штамма FM2 и от 250 до 280 нм у штамма FM1. Анализ электронно-микроскопических изображений показывает, что у обоих штаммов везикулы являются производными наружной мембраны. Для выяснения вопроса о составе содержи-

го везикул и их роли требуются дополнительные исследования.

Физиолого-биохимические свойства. Штаммы FM1 и FM2 относятся к аэробным, хемоорганотрофным, оксидазо- и каталазоположительным бактериям, представителям рода *Chryseobacterium* (рис. 6). Они растут в диапазоне температур 9–30°C с оптимумом при 25–28°C, что позволило отнести их к мезофильным организмам. Как было показано ранее (Сузина и соавт., 2011, 2015), рост изученных в этих работах штаммов *Chryseobacterium* sp. NF4 и NF5 наблюдался при более низких температурах (до 5°C), с оптимумом роста при 28°C (табл. 1).

Оптимальный для роста всех изолятов рН находился в нейтральной области, однако для штаммов FM1 и FM2 был несколько смещен в область низких значений. Кроме того, штаммы FM1 и FM2 отличались более высокой галотолерантностью по сравнению со штаммами *Chryseobacterium* sp. NF4 и NF5; они способны расти при наличии в среде 4 и 3% NaCl соответственно. В качестве источника углерода и энергии штаммы *Chryseobacterium* sp. NF4 и NF5 использовали узкий набор органических, в том числе, жирных кислот, а также несколько сахаров и полисахаридов, в то время как спектр субстратов, ассимилируемых штаммами FM1 и FM2, был более широким за счет увеличения числа утилизируемых органических кислот.

Сравнительный анализ физиологических свойств штаммов FM1 и FM2 с типовым близкородственным штаммом *C. antarcticum* выявил ряд дополнительных отличий между ними. Так *C. antarcticum* может ассимилировать Твин-80, в то время как штаммы FM1 и FM2 такой способностью не обладают. Но, в отличие от *C. antarcticum*, они имеют фермент β-глюкозидазу и расщепляют D-фруктозу. Кроме того, температурный оптимум роста у исследуемых штаммов ниже, чем у типового штамма *C. antarcticum* (25 и 30°C соответственно) (Kämpfer et al., 2009).

Между собой штаммы FM1 и FM2 демонстрируют высокую степень сходства как по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК (99.5%), так и по молярным процентам Г + Ц (35.9 и 35.4% соответственно), что свидетельствует о возможной их принадлежности к одному виду. Различия между штаммами состоят в том, что у штамма FM1 выявляется активность ферментов липазы и лизиндекарбоксылазы, в то время как у штамма FM2 она не проявляется.

Анализ антибиотикорезистентности штаммов FM1 и FM2 показал, что они оба устойчивы к действию пенициллина, триметоприма, цефазолина, канамицина, ампицилина, оксациллина и чувствительны к рифампицину, хлорамфениколу, стрептомицину, гентамицину, тетрациклину,

эритромицину, амикацину, бацитрацину и фурадонину (табл. 2).

Изучение антагонистической активности показало, что штаммы FM1 и FM2 не ингибируют рост тестированных грамположительных и грамотрицательных бактерий, использованных в работе.

Филогенетическое положение штаммов FM1 и FM2. На основании филогенетического анализа фрагментов генов 16S рРНК длиной около 1200 п.н. исследуемые бактерии были отнесены к роду *Chryseobacterium*. Наиболее близкородственным видом для обоих штаммов является *C. antarcticum* (типовой штамм AT1013): уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых штаммов и типового штамма *C. antarcticum* AT1013 составляет 98.42% (рис. 6). Сравнительный анализ физиологических свойств этих штаммов выявил ряд дополнительных отличий (см. выше) между ними.

Рестрикционный анализ геномов выделенных штаммов. Как ранее нами было установлено, что для рестрикционного анализа генома бактерий, принадлежащих к роду *Chryseobacterium*, наиболее подходящими эндонуклеазами рестрикции являются ферменты *NheI* и *SpeI* (Сузина и соавт., 2011). В связи с этим первоначально рестрикционный анализ исследуемых штаммов осуществляли также с помощью этих ферментов. Однако полученные результаты показали, что они не являются оптимальными для генотипирования штаммов *Chryseobacterium* spp. FM1 и FM2 ввиду образования большого количества рестрикционных фрагментов малого размера (рис. 7). Расположение фрагментов ДНК на электрофореграмме показало очевидное геномное сходство штаммов FM1 и FM2. В то же время, при использовании рестриктазы *NheI* фингерпринт штамма FM2 характеризовался наличием двух дополнительных полос (72 и 125 т.п.н.) в отличие от фингерпринта штамма FM1. При использовании рестриктазы *SpeI* также отмечается разница в размере верхних фрагментов (177 т.п.н. у штамма FM1 и 195 т.п.н. у штамма FM2). Наиболее четкое разделение рестрикционных полос наблюдалось при использовании ферментов *SgsI* и *NotI*, при этом оба штамма имели идентичный профиль фрагментов (рис. 8).

Рестрикционный профиль геномов штаммов *Chryseobacterium* sp. NF4 и NF5, выделенных нами ранее из образцов почвы (Сузина и соавт., 2011), значительно отличался от рестрикционных профилей штаммов *Chryseobacterium* sp. FM1 и FM2 (рис. 7). Это может свидетельствовать о принадлежности штаммов, выделенных с кожных покровов лягушки *Xenopus laevis*, и штаммов NF4 и NF5 к разным видам.

Таблица 1. Сравнительная характеристика некоторых свойств *Chryseobacterium* sp. FM1, FM2 и *Chryseobacterium* sp. NF4 и NF5

Свойства	FM1	FM2	NF4*	NF5*
Источник выделения	Кожные покровы <i>Xenopus laevis</i>	Кожные покровы <i>Xenopus laevis</i>	Ил (оз. Байкал)	Нефтешлам (Нижекамск)
Морфология	Палочки, короткие овоиды и кокки	Палочки, короткие овоиды и кокки	Короткие палочки и коккоиды	Короткие палочки и коккоиды
Размеры клеток, мкм	0.6–0.8 × 0.2–0.5	0.3–0.7 × 0.2–0.25	0.2–0.4 × 0.2–0.5	0.2–0.4 × 0.2–0.5
Объем клеток, мкм ³	0.05–0.07	0.01–0.02	0.01–0.04	0.01–0.04
Тип клеточной стенки	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр ⁻
Температурный диапа- зон роста (оптимум), С°	9–30 (25)	9–30 (25)	5–30 (28)	5–30 (28)
Диапазон рН (оптимум для роста)	6–8.5 (7–7.5)	6.5–9 (7.5)	6–9 (7–8)	6–9 (7–8)
Диапазон NaCl, % (оптимум для роста)	0–4 (0)	0–3 (1)	0–1 (0)	0–1 (0)
Активность ферментов:				
Оксидаза	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Уреаза	–	–	–	–
β-Галактозидаза	–	–	–	–
Желатиназа	–	–	–	–
Продукция индола	+	+	+	+
Восстановление NO ³⁻ до NO ²⁻	–	–	–	–
Восстановление NO ³⁻ до N ₂	–	–	–	–
Лизиндекарбоксилаза	+	–	Ho	Ho
Липаза	+	–	Ho	Ho
β-Глюкозидаза	+	+	Ho	Ho
α-Глюкозидаза	+	+	Ho	Ho
α-Мальтозидаза	+	+	Ho	Ho
L-Аспаргатариламидаза	+	+	Ho	Ho
Гидролиз:				
Твин-80	–	–	–	–
Твин-60	+/-	+/-	+	+
Твин-40	–	–	–	–
Твин-20	–	–	–	–
Целлюлоза	–	–	–	–
Эскулин железа цитрат	+	+	+/-	+/-
Казеин	–	–	–	–
Крахмал	+/-	+/-	+	+
Ассимиляция:				
Глюкоза	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+
Лактоза	+/-	–	–	–
Манноза	–	–	–	–

Таблица 1. Окончание

Свойства	FM1	FM2	NF4*	NF5*
Маннит	–	–	–	–
Арабиноза	–	–	–	–
Цитрат	+	+	+	–
Пируват	+	+	+	+/-
Пропионат	+	+	+	–
Лактат	+	+	+	+
Ацетат	+	+	–	+/-
Сукцинат	+	+	+	+

* Штаммы охарактеризованы в работах (Сузина и соавт., 2011, 2015); Но – не определяли.

ОБСУЖДЕНИЕ

Описанные в настоящей работе штаммы *Chryseobacterium* sp. FM1 и FM2 являются первыми ультрамелкими бактериями, обнаруженными на кожных покровах лягушки *X. laevis*. Средний объем клеток этих бактерий, сохраняющийся у них при росте на всех использованных в настоящей работе средах, составляет <0.1 мкм³. По этим показателям изученные бактерии близки к ультрамикробактериям (УМБ), описанным в работах (Cavicchioli, Ostrowski, 2003; Duda, 2011; Сузина и соавт., 2011, 2015). Однако для окончательного заключения о принадлежности изученных бактерий к УМБ желательнее провести сравнительное

изучение размера геномов у штаммов FM1 и FM2 и известных видов УМБ.

Следует отметить, что согласно филогенетическому анализу нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штаммов FM1 и FM2, эти организмы являются представителями рода *Chryseobacterium*. Генотипирование, осуществленное с помощью ферментов рестрикции *SpeI*, *NheI*, *SgsI* и *NotI* подтвердило принадлежность штаммов к одному виду. С этим выводом коррелируют также полученные нами данные об ультраструктурной организации изученных штаммов. Установлено, что клетки штаммов FM1 и FM2, как и клетки штаммов *Chryseobacterium* sp., NF4 и NF5, облада-

Таблица 2. Устойчивость штаммов FM1 и FM2 к антибиотикам

Антибиотик, мкг/мл	Штамм	
	FM1	FM2
Пенициллин, 100	+	+
Триметоприм, 100	+	+
Канамицин, 25, 50	+	+
Цефазоллин, 100	+	+
Ампициллин, 250	+	+
Оксациллин, 10	+	+
Рифампицин, 25	–	–
Хлорамфеникол, 25	–	–
Стрептомицин, 25	–	–
Гентамицин, 10	–	–
Тетрациклин, 10	–	–
Эритромицин, 15	–	–
Амикацин, 30	–	–
Бацитрацин, 10	–	–
Фурадонин, 300	–	–

Примечание. “+” – устойчивы; “–” – чувствительны.

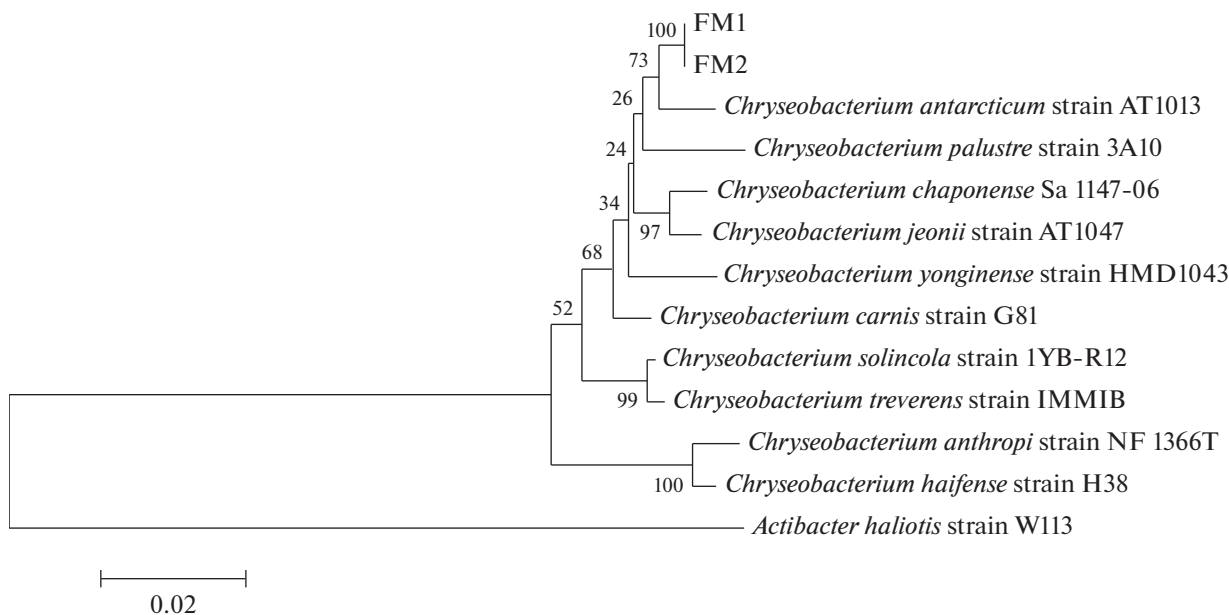


Рис. 6. Положение штаммов *Chryseobacterium* FM1, FM2 на филогенетическом дереве близких видов рода *Chryseobacterium*, полученном на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК (“neighbor-joining method”). Эволюционные дистанции между последовательностями рассчитаны с использованием однопараметрической модели Джукса–Кантора (Jukes–Cantor model). Масштаб соответствует одной замене на каждые 100 нуклеотидов. Указаны значения статистической достоверности порядка ветвления для 1000 альтернативных деревьев “bootstrap” (выше 50%). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рПНК *Actibacter haliotis* DSM 19423^T (NZ_ATXP01000015).

ют типичной грамтрицательной стенкой, состоящей из наружной мембраны с трехслойным профилем на срезах, муреинового слоя и периплазмы. На поверхности этой оболочки расположен фибриллярный капсулярный слой и фимбриоподобные структуры (рис. 3а–3в, 5). Клетки изученных УГОБ, как отмечалось выше, прочно адсорбированы на поверхности кожи лягушек, и прочности их адсорбции, по-видимому, способствуют адгезивные свойства охарактеризованных выше фимбриоподобных отростков и капсулярного слоя. Электронная микроскопия ультратонких срезов кожных покровов лягушки позволила выявить локализованные на них несмывающиеся с поверхности бактериальные клетки, размеры и ультраструктурная организация которых обладали значительным сходством с таковыми у УМБ из рода *Chryseobacterium* (Сузина и соавт., 2011, 2015). По-видимому, эти бактерии выполняют у лягушек защитную функцию. В пользу наличия своеобразного бактериального фильтра свидетельствуют полученные нами данные о высокой концентрации клеток бактерий эпibiонтов на поверхности кожи *X. laevis*: даже после тщательной отмывки на 1 мкм² локально остается свыше 12 прочно прикрепленных клеток. Как показано, именно “кожные бактерии” предотвращают гибель и заболеваемость лягушек, обусловленные

патогенными хитридиомицетами (Shaw et al., 2014).

Поверхность кожных покровов лягушек представляет собой уникальную микробную эконишу, так как кожа этих земноводных покрыта слизью и выделяет, часто в высоких концентрациях, многочисленные антибиотические вещества (Zasloff, 1987; Zairi et al., 2009; Conlon et al., 2012; King et al., 2012; Clay, 2014). Очевидно, что микроорганизмы-эпibiонты должны быть адаптированы к этим факторам их экониши. Особенностью клеток штаммов FM1 и FM2 является спектр утилизируемых ими субстратов, более широкий, чем у описанных нами ранее штаммов NF4 и NF5. Возможно, это связано со способностью изучаемых штаммов использовать в качестве источника углерода и энергии органические соединения, выделяемые макроорганизмом-хозяином. Кроме того, штаммы FM1 и FM2 характеризуются устойчивостью к ряду антибиотиков (табл. 2). Возможно, что они также устойчивы к пептидным антибиотикам, продуцируемым лягушками.

Сравнительный анализ морфологических признаков штаммов FM1 и FM2 показал их значительное сходство по таким признакам, как оптимальные условия культивирования, спектр ассимилируемых субстратов, активность ферментов и устойчивость к антибиотикам. Оба штамма имеют ряд существенных генетических и физио-

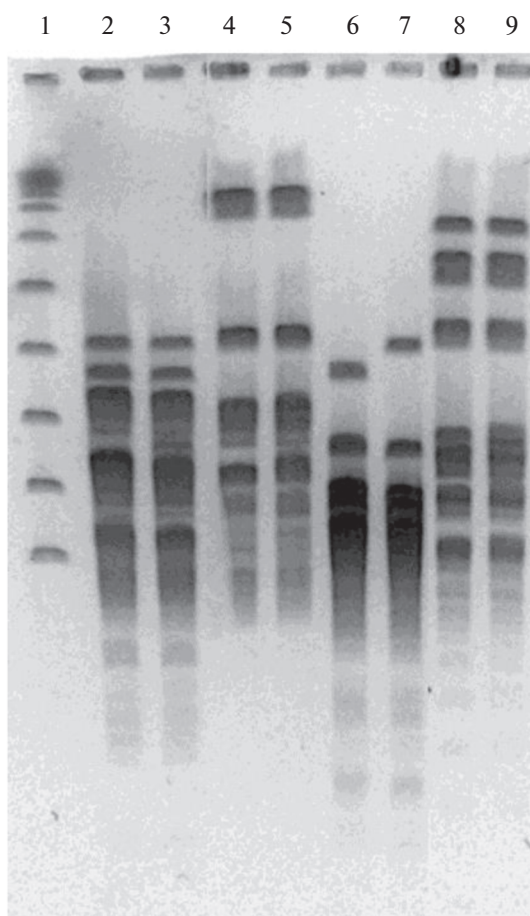


Рис. 7. Электрофореграмма рестриционных фрагментов геномов штаммов *Chryseobacterium* sp. FM1, FM2, NF4, NF5. Дорожки: 1 – Lambda Ladder; 2, 3 – штаммы FM1, FM2, эндонуклеаза рестрикции *NheI*; 4, 5 – штаммы NF4, NF5, эндонуклеаза рестрикции *NheI*; 6, 7 – штаммы FM1, FM2, эндонуклеаза рестрикции *SpeI*; 8, 9 – штаммы NF4, NF5, эндонуклеаза рестрикции *SpeI*.

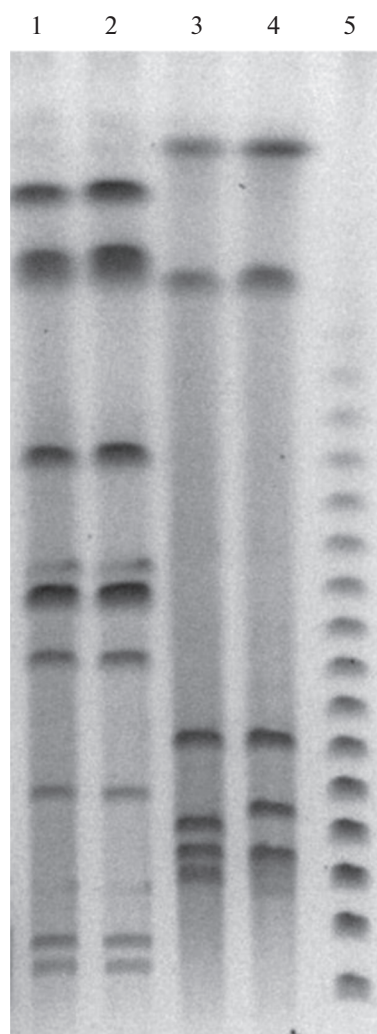


Рис. 8. Электрофореграмма рестриционных фрагментов геномов штаммов *Chryseobacterium* sp. FM1 и FM2. Дорожки: 1, 2 – штаммы FM1, FM2, эндонуклеаза рестрикции *SgsI*; 3, 4 – штаммы FM1, FM2, эндонуклеаза рестрикции *NotI*; 5 – Lambda Ladder.

лого-биохимических отличий от наиболее близкородственного им вида *C. antarcticum* AT1013, и они, возможно, представляют собой новый вид рода *Chryseobacterium*. В настоящее время известно, что род *Cryseobacterium* объединяет как сапрофитные, так и патогенные формы, выделяющиеся из различных местообитаний: почв, пресных водоемов, растений, насекомых, грунтов Антарктики (Vandamme et al., 1994; Boronina et al., 2003; Сузина и соавт., 2011). Представители всех описанных в литературе видов этого рода являются грамотрицательными, аэробными, гетеротрофными, мезофильными и психротолерантными бактериями (Boronina et al., 2003; Euzéby, 2009). Выделение и описание новых ультрамелких бактерий *Chryseobacterium* sp. FM1 и FM2, обитающих на коже лягушек *Xenopus laevis*, расширяет сведения об объеме и разнообразии микроорганизмов рода *Chryseobacterium*. Кроме того, эти

штаммы представляют значительный биотехнологический интерес для конструирования наноконтейнеров, предназначенных для целевой доставки лекарственных средств в организм человека и животных.

Электронно-микроскопические исследования выполнены на базе ЦКП “Коллекция UNIQEM”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 32 “Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий”, Подпрограмма 3 “Нанобиотехнологии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Сузина Н.Е., Дуда В.И., Есикова Т.З., Шорохова А.П., Гафаров А.Б., Олейников Р.Р., Акимов В.Н., Абашина Т.Н.,

- Полищцева В.Н., Боронин А.М. Новая ультрамикробактерия из рода *Chryseobacterium* – факультативный эпибонт *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 529–542.
- Suzina N.E., Duda V.I., Esikova T.Z., Shorokhova A.P., Gafarov A.B., Oleinikov R.R., Abashina T.N., Akimov V.N., Polivtseva V.N., Boronin A.M. Novel ultramicrobacteria, strains NF4 and NF5, of the genus *Chryseobacterium*: facultative epibionts of *Bacillus subtilis* // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 535–548.
- Сузина Н.Е., Есикова Т.З., Олейников Р.Р., Гафаров А.Б., Шорохова А.П., Полищцева В.Н., Росс Д.В., Абашина Т.Н., Дуда В.И., Боронин А.М. Сравнительная характеристика свободноживущих ультрамелких бактерий, выделенных из природных биотопов // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 151–160.
- Suzina N.E., Esikova T.Z., Oleinikov R.R., Gafarov A.B., Shorokhova A.P., Polivtseva V.N., Ross D.V., Abashina T.N., Duda V.I., Boronin A.M. Comparative characteristics of free-living ultramicroscopical bacteria obtained from natural biotopes // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 159–168.
- Antwis R.E., Haworth R.L., Engelmoer D.J.-P., Ogilvy V., Fidgett A.L., Preziosi R.F. *Ex situ* diet influences the bacterial community associated with the skin of red-eyed tree frogs (*Agalychnis callidryas*) // PLoS One. 2014. V. 9. e85563.
- Becker M.H., Harris R.N. Cutaneous bacteria of the redback salamander prevent morbidity associated with a lethal disease // PLoS One. 2010. V. 5. e10957.
- Belden L.K., Harris R.N. Infectious diseases in wildlife: the community ecology context // Front. Ecol. Environ. 2007. V. 5. P. 533–539.
- Bell S.C., Alford R.A., Garland S., Padilla G., Thomas A.D. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay // Dis. Aquat. Organ. 2013. V. 103. P. 77–85.
- Bernardet J.-F., Nakagawa Y., Holmes B. Subcommittee on the taxonomy of *Flavobacterium* and *Cytophaga*-like bacteria of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1049–1070.
- Bevins C.L., Zasloff M. Peptides from frog skin // Annu. Rev. Biochem. 1990. V. 59. P. 395–414.
- Boronina L.G., Kukushkina M.P., Krutova K.V., Blinova S.M. *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) spp.: clinical significance, identification, antimicrobial susceptibility // Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother. 2003. V. 5. P. 243–250.
- Brucker R.M., Harris R.N., Schwantes C.R., Gallaher T.N., Flaherty D.C., Lam B.A., Minbiole K.P. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus* // J. Chem. Ecol. 2008. V. 34. P. 1422–1429.
- Bulet P., Stöcklin R., Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // Immunol. Rev. 2004. V. 198. P. 169–184.
- Cavicchioli R., Ostrowski M. Ultramicrobacteria // eLS. Chichester John Wiley & Sons Ltd. 2003. doi 10.1038/npg.els.0000309
- Clay K. Defensive symbiosis: a microbial perspective // Funct. Ecol. 2014. V. 28. P. 293–298.
- Conlon J.M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions // Cell. Mol. Life. Sci. 2011. V. 68. P. 2303–2315.
- Conlon J.M., Mechkarska M., King J.D. Host-defense peptides in skin secretions of African clawed frogs (Xenopodinae, Pipidae) // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. V. 176. P. 513–518.
- Duda V.I. Ultramicrobacteria // eLS. Chichester. UK. John. Wiley & Sons Ltd. 2011. P. 1–23. doi 10.1002/9780470015902.a0000309.pub2
- Euzéby J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Chryseobacterium* // www.bacterio.net. 2009. P. 1–19.
- Hector J.S., Johnson A.R. Determination of genome size of *Pseudomonas aeruginosa* by PFGE: analysis of restriction fragments // Nucleic Acids. Res. 1990. V. 18. P. 3171–3174.
- Kämpfer P., Lidders N., Vanechoutte M., Wauters G. Transfer of *Sejorgia antarctica*, *Sejorgia jeonii*, and *Sejorgia marina* to the genus *Chryseobacterium* as *Chryseobacterium antarcticum* comb. nov., *Chryseobacterium jeonii* comb. nov. and *Chryseobacterium marinum* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2238–2240.
- King J.D., Mechkarska M., Coquet L., Leprince J., Jouenne T., Vaudry H., Takada K., Conlon J.M. Host-defense peptides from skin secretions of the tetraploid frogs *Xenopus petersii* and *Xenopus pygmaeus*, and the octoploid frog *Xenopus leduensis* (Pipidae) // Peptides. 2012. V. 33. P. 35–43.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208–218. http://dx.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208–212.
- Shaw S.D., Berger L., Bell S., Dodd S., James T.Y., Skerratt L.F., Bishop P.J., Speare R. Baseline cutaneous bacteria of free-living New Zealand native frogs (*Leiopelma archeyi* and *Leiopelma hochstetteri*) and implications for their role in defense against the amphibian chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) // J. Wildl. Dis. 2014. V. 50. P. 723–732.
- Vandamme P., Bernardet J.-F., Segers P., Kersters K., Holmes B. New perspectives in the classification of the Flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 827–831.
- Zairi A., Tangy F., Bouassida K., Hani K. Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin-new sources for a promising spermicides microbicides – a mini review // J. Biomed. Biotechnol. 2009. V. 2009. Article ID. 452567.
- Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 5449–5453.

Characterization of Ultrasmall *Chryseobacterium* Strains FM1 and FM2 Isolated from *Xenopus laevis* Skin

D. V. Ross¹, N. E. Suzina¹, A. B. Gafarov¹, A. V. Machulin¹, T. Z. Esikova¹, A. P. Shorokhova¹, V. I. Duda^{1,*}, and A. M. Boronin¹

¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

**e-mail: duda@ibpm.pushchino.ru*

Received September 25, 2018

Revised October 30, 2018

Accepted November 30, 2018

Two strains of ultrasmall gram-negative bacteria (USGNB), FM1 and FM2, were isolated from the skin of the smooth clawed frog *Xenopus laevis*. The cytological, physiological, biochemical, and genotypic characteristics of the isolates were studied. Based on the sequencing of their 16S rRNA genes and on their phenotypic properties, the isolates were assigned to the genus *Chryseobacterium*. The cells were extremely small, with cell volumes of ~ 0.06 and $\sim 0.015 \mu\text{m}^3$ for developing cultures of strains FM1 and FM2, respectively. Since the USGNB cells were firmly attached to the skin surface and could not be removed by repeated washing with water, these bacteria may be classified as epibionts. Adhesive properties of the fimbria-like appendages revealed in strains FM1 and FM2 by electron microscopy could probably contribute to tight binding of USGNB cells to the skin. Localization of ultrasmall gram-negative bacteria on skin surface of the frogs may indicate their action as a protective bacterial filter; skin surface of *Xenopus laevis* is thus characterized for the first time as a specific habitat of ultrasmall *Chryseobacterium* strains. Isolation and characterization of two ultrasmall *Chryseobacterium* strains, FM1 and FM2, improves our understanding of diversity of the cellular structural and functional characteristics and of the ecological niches of this bacterial genus.

Keywords: ultramicrobacteria, ultrasmall symbiotic bacteria, *Chryseobacterium* strains, amphibian epibionts, electron microscopy of microorganisms