

# Цито-физиологическая характеристика двух штаммов грамположительных ультрамикробактерий, выделенных с кожного покрова серой жабы *Bufo bufo* и оценка их биотехнологического потенциала

Сузина Н.Е.<sup>1</sup>, Абашина Т.Н.<sup>1,2</sup>, Поливцева В.Н.<sup>1</sup>, Соболева О.И.<sup>2</sup>,  
Сорокин В.В.<sup>3</sup>, Звонарев А.Н.<sup>1</sup>, Мачулин А.В.<sup>1</sup>, Шорохова А.П.<sup>1</sup>, Дуда В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
[suzina\\_nataliya@rambler.ru](mailto:suzina_nataliya@rambler.ru)

<sup>2</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт

<sup>3</sup>ФИЦ «Биотехнология» РАН

Микробные симбионты (эпibiонты) кожных покровов земноводных способны продуцировать различные вещества, обладающие высокой антимикробной активностью, тем самым с одной стороны предотвращая колонизацию покровов болезнетворными микроорганизмами из окружающей среды и параллельно стимулируя секрецию защитных пептидов кожными железами лягушек (Conlon et al., 2012; Clay, 2014; King et al., 2012). Многие из культивируемых симбионтов земноводных являются продуцентами ряда перспективных для биотехнологии биологически активных веществ. Исследования последних десятилетий обнаружили, что поверхность кожных покровов земноводных южных ареалов распространения является местом обитания представителей более тридцати родов бактерий, таких как *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Pseudoclavibacter*, *Rhodococcus* и др. (Antwis et al., 2014; Becker et al., 2015; De Assis et al. 2017). В то же время, информация о выделении ультрамикробактерий (УМБ) из подобных источников практически отсутствует. Недавно с поверхности кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (ареал обитания: Центральная и Южная Африка) нами были выделены два штамма УМБ, относящийся к роду *Chryseobacterium* (штаммы FM1 и FM2) (Росс с соавт., 2019). Информация о микробиоме кожных покровов серой жабы *Bufo bufo*, которая широко распространена в средней полосе России, фактически отсутствует. Исследования в этой области не ведутся.

С поверхности слизистых кожных покровов серой жабы *Bufo bufo* нами были выделены два штамма УМБ: Bht2 и Bht3. По результатам анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК эти штаммы были отнесены к родам актинобактерий *Nocardioides* sp. (шт. Bht2) и *Marmoricola* sp. (шт. Bht3). Оба штамма представлены ультрамелкими грамположительными кокковидными клеточными формами.

Проведенные микробиологические и морфометрические исследования с применением фазово-контрастной микроскопии по сравнительному изучению размеров/объемов клеток обоих штаммов в условиях роста на питательных средах различного состава и концентрации (среда 5/5, R2A, TSA, BBL и их разведенные в 10 раз варианты) показали, что оба штамма различаются по скорости роста и требовательности к концентрации испытываемых питательных сред. Штамм Bht2 отличается быстрым ростом практически на всех вариантах сред, в то время как штамм Bht3 является медленно растущей культурой даже в условиях роста на богатых питательных средах TSA и LB. Клетки штамма Bht2 представлены ультрамелкими клетками кокковидной формы диаметром 0,3–0,35 мкм, в условиях роста, как на богатых, так и на бедных средах. Размер клеток штамма Bht3 варьирует и своего минимального значения достигает на среде R2A и ее разбавленном варианте ( $d = 0,3$  мкм), на богатых средах данный штамм представлен рефрактерными кокками диаметром 0,35–0,4 мкм.

Изучены физиолого-биохимические особенности изолятов с применением тест систем «bioMerieux» (Франция). Результаты исследования позволяют сделать вывод, что штаммы Bht2 и Bht3 являются уреазо-отрицательными, оксидаза- и каталаза-положительными, способны разжижать желатин и утилизировать цитраты. В то же время, имеются и существенные

различия между изолятами. Штамм Bht2 способен утилизировать широкий ряд соединений: L-арабинозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-маннит, амигдалин, эскулин, салицин, D-целлобиозу, D-мальтозу, D-сахарозу, D-трегалозу, D-меллицитозу, ксилит, гентибиозу, D-гуранозу, в отличие от него штамм Bht3 не способен к утилизации исследуемых сахаров.

На моделях новых грамположительных изолятов шт. Bht2 и Bht3 проведены эксперименты по получению магнитотактных наноконтейнеров. Показано, что в модельных экспериментах в условиях инкубации в разработанной авторами среде, содержащей минеральную форму железа, клетки обоих штаммов приобретают способность двигаться в направлении приложенного постоянного магнита, сохраняя при этом целостность (полное отсутствие лизиса) и минимальный для этих штаммов размер/объем клеток. Таким образом, оба штамма представляются весьма перспективными для дальнейшей разработки на их основе средств доставки терапевтических агентов в различные органы и ткани человека и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Основы высоких технологий и использование особенностей наноструктур в науках о природе».

#### Литература

1. Clay K. Defensive symbiosis: a microbial perspective // *Funct. Ecol.* 2014. V. 28. P. 293–298.
2. 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.
3. 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 lenduensis* (Pipidae) // *Peptides.* 2012. V. 33. P. 35–43.
4. De Assis A.B., Barreto C.C., Navas C.A. Skin microbiota in frogs from the Brazilian Atlantic Forest: Species, forest type, and potential against pathogens // *PLoS One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179628> July 5, 2017.
5. Becker M. H., Walke J. B., Murrill L., Woodhams D.C., Reinert L.K., Rollins-Smith L. A., Burzynski E. A., Umile T.P., Minbiole K.P.C., Belden L.K. Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* // *Molecular Ecology.* 2015. Vol. 24, P. 1628–1641.
6. Росс Д.В., Сузина Н.Е., Гафаров А.Б., Мачулин А.В., Есикова Т.З., Шорохова А.П., Дуда В.И., Боронин А.М Характеристика ультрамелких бактерий рода *Chryseobacterium* FM1 и FM2, выделенных с кожных покровов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* // *Микробиология*, 2019, Т. 88, № 2, с. 184–196.