УДК 597-143.4:576

Анализ люминесцирующей микрофлоры кишечника рыб студёных морей: Белого, Берингова и Охотского

М.Н. Коноплёва[1], С.А. Хрульнова[2], М.С. Осетрова[1,2], Д.И. Дёгтев[1,2], И.В. Манухов[1,2], Г.Б. Завильгельский[2]

[1] Московский физико-технический институт (государственный университет) (МФТИ, г. Долгопрудный)

[2] Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ФГУП «ГосНИИгенетика», г. Москва)

E-mail: manukhovi@mail.ru

Настоящее исследование посвящено изучению видового состава светящихся бактерий, обитающих в кишечном тракте рыб акваторий студёных морей в летний и зимний период. В ходе экспедиций в зимний период 2010 г. и летний период 2014 г. с целью изучения возможного сезонного изменения состава кишечной микрофлоры рыб, обитающих в акваториях студёных морей, а также с целью проведения поиска люминесцентных симбионтов и паразитов, в том числе возможных патогенов, были собраны образцы как свободноживущей пелагиальной микрофлоры, так и микрофлоры кишечников рыб в районах Белого, Берингова и Охотского морей. Результатом проведённых экспедиций стало выделение 21 штамма светящихся бактерий в зимний период и 25 штаммов в летний период. Показано видовое замещение бактерий, заселяющих кишечник рыб — обитателей Берингова и Охотского морей, связанное с сезонными колебаниями температур морских поверхностных вод: в летний период бактерии вида *P. phosphoreum* замещают другие бактерии *A. logei*, преобладающие в зимний сезон низких температур. Примечательно, что оба вида относятся к психрофильным бактериям. В составе кишечной микрофлоры рыб, обитающих в акваториях студёных морей, психрофильные светящиеся бактерии являются часто встречающимися, порой доминирующими. Анализ последовательности «house-keeping»-генов двух штаммов, определённых как *A. logei* по биохимическим параметрам, показал близость данных штаммов к виду *A. salmonicida*. Расхождение данных биохимического и филогенетического анализа для ряда биолюминесцирующих штаммов свидетельствует о необходимости видовой реклассификации. Показана высокая вариабельность некодирующей области между консервативными генами *luxR1* и *luxC*, содержащейся в структуре *lux*-оперона *A. logei*. По-видимому, вариабельность этого участка связана со сравнительно недавней утратой способности к экспрессии гена *luxI*, остатки которого находятся в *luxR1-luxC*-области *lux*-оперона.

Ключевые слова: *Aliivibrio logei*, *Photobacterium phosphoreum*, биолюминесценция, *lux*-оперон, психрофильные бактерии, биолюминесценция, видовой состав, Белое море, Охотское море, Берингово море, сезонные изменения микрофлоры.

Введение

Подавляющее большинство биолюминесцентных бактерий, обитающих в морях и океанах, принадлежит семейству Vibrionaceae, которое включает в себя роды *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*. Четыре вида бактерий *A. fischeri*, *A. logei*, *A. salmonicida*, *A. wodanis* ранее входили в состав рода *Vibrio*, в настоящее

время формируют самостоятельный род *Aliivibrio* внутри семейства *Vibrionaceae* [Bang et al., 1978; Urbanczyk et al., 2007; Beaz-Hidalgo et al., 2010]. В геноме люминесцирующих бактерий содержатся гены *lux*-оперона, которые определяют способность бактерий к свечению (люминесценции). Структуры *lux*-оперонов подробно изучены и описаны [Engebrecht, Silverman, 1984; Swartzman, Kapoor, 1990; Stevens, Greenberg, 1997; Manukhov et al., 2011]. Есть сообщения о том, что наличие *lux*-оперона необходимо для успешной колонизации люминесцирующими бактериями животных-хозяев [Ruby et al., 1999]. Светящиеся морские бактерии представлены как психрофилами, так и мезофилами, которые отличаются между собой способностью к росту при низких или высоких температурах соответственно. Психрофильные бактерии нормально существуют и размножаются при температуре близкой к 0 °С и не способны к этому при температуре свыше 30 °С, в отличие от мезофильных бактерий, которые не растут уже при плюс 4 °С, но обладают способностью к росту при 30 °С и выше. Оптимальная температура роста для психрофильных бактерий плюс 10–15 °С, которая является минимально возможной для роста мезофилов.

Глубина и градиент температуры воды играют определяющую роль в заселении светящимися бактериями морей и океанов [Deming et al., 2002; D'Amico et al., 2006]. В верхних слоях тёплых морей преобладают мезофилы, большей частью представленные видом *V. harveyi* [Nealson, Hastings, 2006]. С увеличением толщи воды и снижением температуры происходит видовое замещение бактерий. На глубине от 200 м, где температура опускается ниже плюс 15 °С, доминируют психрофилы, в основном *P. phosphoreum*. Оптимальной средой обитания для психрофильных бактерий также являются верхние слои студёных морей Арктики и Антарктики.

Однако, сезонные колебания температуры поверхностного слоя морских вод, прогреваемого солнечными лучами, оказываются значительными. В летний период температура вод поверхностного слоя и прибрежной зоны Белого, Берингова и Охотского может достигать плюс 17 °С. Существенные сезонные колебания температуры верхнего слоя морских вод наводит на предположение о возможном видовом замещении люминесцирующей микрофлоры кишечника рыб Охотского и Берингова морей с мезофильных бактерий на психрофильные в ходе смены сезонов в течение года.

Настоящее исследование посвящено изучению видового состава светящихся бактерий, обитающих в кишечном тракте рыб акваторий студёных морей: Белого, Берингова и Охотского в летний и зимний период. Проведён филогенетический анализ изолированных штаммов на основе последовательности генов *lux*-оперона и 16S рРНК.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Объектом исследований являются новые штаммы психрофильных морских люминесцирующих бактерий, изолированные в разных сезонах года.

В зимний период 2010 г. выделены штаммы морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море у мыса Левашова: NML — навага; KCh1, BML1–BML6, BML8 — бычок; KAM1–KAM4 — камбала; в слабосолёном оз. Калагирь, соединяющемся с Беринговым морем: KCh1–KCh3, KCh5–KCh8 — корюшка; в Белом море: BM1, BM2 — керчак.

В летний период 2014 г. изолированы штаммы морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море у мыса Левашова: 148, 1430 — горбуша; 149, 1430, 1432.1, 1432.2, 1437, 1439 — навага; 1417 — кета; 1445 — камбала; 1448 — керчак; в Беринговом море: 1440 — керчак; 1457, 14100 — горбуша; в Чёрном море: SChm1, SChm2, SChm3, SChm4 — ставрида; KChm1 — керчак; в Южно-Китайском море у о. Хайнань: Chin2, Chin5.

Ряд штаммов депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП «ГосНИИгенетика» (табл. 1).

В работе использовали референсные штаммы светящихся бактерий:

морские бактерии *Aliivibrio fischeri* ATCC29985^T, *A. fischeri* MJ-1, *A. fischeri* МГУ-6 (получены на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ от А.П. Зарубиной);

Таблица 1. Штаммы, выделенные в 2010 г., депонированные в ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика»

Обозначение	Номер ВКПМ	Источник (где найден, откуда выделен)
1. *A. logei*	NML B-11098	Мыс Левашова, эстуарий реки Большая, впадающей в Охотское море. Кишечник дальневосточной наваги *Eleginus gracilis*
2. *A. logei*	BM1 B-10407	Белое море, Ругозерская губа. Кишечник керчака
3. *A. logei*	BM2 B-11095	Белое море, Великая Салма. Кишечник керчака
4. *A. logei*	KCh1 B-10409	Охотское море, мыс Левашова. Кишечник бычка *Cottida* spp.
5. *A. logei*	KCh2 B-10410	Оз. Калагирь (восточное побережье Камчатки). Кишечник корюшки *Hypomesus olidus*
6. *A. logei*	KCh3 B-11096	
7. *A. logei*	KCh5 B-11097	
8. *A. logei*	KCh6 B-11099	
9. *A. logei*	KCh7 B-11102	
10. *A. logei*	KCh8 B-11101	
11. *A. logei*	BML1 B-12137	Охотское море, мыс Левашова, выделен из кишечника бычка *Cottida* sp.
12. *P. phosphoreum*	BML2 B-12138	
13. *A. logei*	BML3 B-12139	
14. *P. phosphoreum*	BML4 B-12140	
15. *P. phosphoreum*	BML5 B-12141	
16. *A. logei*	BML6 B-12142	
17. *A. logei*	BML8 B-12143	
18. *P. phosphoreum*	KAM1 B-12145	Охотское море, мыс Левашова Кишечник камбалы *Pleuronectes* spp.
19. *A. logei*	KAM2 B-12146	
20. *A. logei*	KAM3 B-12147	
21. *P. phosphoreum*	KAM4 B-12148	
22. *A. salmonicida*	B-11103	NCIMB2262^{T}J Romalde (Испания)

наземные бактерии, обитатели кишечника нематод, паразитирующих на насекомых *Photorhabdus luminescens* ZM1 (МГУ, от А.П. Зарубиной);

A. salmonicida NCIMB2262^T (получен от Jesus Romalde) [Beaz-Hidalgo et al., 2010].

Выделение ДНК. Хромосомальную ДНК штаммов выделяли из клеток поздней логарифмической фазы роста при помощи лизиса лизоцимом и SDS с последующей обработкой фенолом и переосаждением в этаноле.

Электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили методом электроэлюции.

Реактивы и среды. Среда для культивирования морских люминесцирующих бактерий SWT содержит: 0,5% триптона, 0,25% дрожжевого экстракта, 1,5% морской соли и 0,3% глицерина. Для получения агаризованной среды к 1 л SWT-среды добавляли 15 г агара.

SWT-среду и SWT-агар автоклавировать при 0,8 атм. 1 час.

Культивирование. Морские бактерии растили на среде SWTm при температуре в интервале от плюс 10 °С до плюс 37 °С.

Измерение биолюминесценции. Интенсивность биолюминесценции клеток определяли в пробах объёмом по 200 мкл в люминометре через определённые интервалы времени.

Инкубация проб проводилась при комнатной температуре. Единицы измерения интенсивности биолюминесценции пропорциональны микровольтам на обкладках фотоэлектронного умножителя. Измерение люминесценции проводилось на следующих приборах: высокочувствительном люминометре «Биотокс-7» и ми-

кропланшетном люминометре LM-01T (Immunotech).

Определение нуклеотидной последовательности. Для анализа последовательности регуляторной области *luxR1-luxC* использовались праймеры:

SV1dir 5' - TCACACCGCCGATGATAATTGGAA - 3';
SV3rev 5' - GCGCCATTTTTGTGGGTAATTATCT - 3'.

Для анализа последовательности 16S рРНК и «house-keeping»-генов (*gapA gyrB pyrH recA* и *rpoA*) использовались следующие праймеры:

lux16SD 5' - CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG - 3'
lux15SR 5' - TGCAGCCCACTCCCATGGTGTGAC - 3'

gapA:
gapAfor1 5' - AAGAGCGCAATGATATTGAAGTTG - 3'
gapArev1 5' - TAGCATCGAATACTGAAGTTTGAG - 3'

gyrB:
22fVf 5' - GAAGTTATCATGACGGTACTTC - 3'
1240rVf 5' - AGCGTACGAATGTGAGAACC - 3'
gyrB 557f 5' - CAACGHGATGGTGGTACNCACTTAG - 3'
gyrB 670r 5' - CCTTCACGNGCATCATCACCAGASG - 3'

pyrH:
pyrH-04-Fw 5' - ATGASNACBAAYCCWAAACC - 3'
PBPRB2966R 5' - GAATCGGCATTTTATGGTCACG - 3

recA:
recAforfisc 5' - TCAAATTGAAAAACAATTTGTAAAGG - 3'
recArevfisc 5' - ATCTTATCACCATTGTAGCTGTACC - 3'

rpoA:
rpoA-01-F 5' - ATGCAGGGTTCTGTDACAG - 3'
rpoA-03-R 5' - GHGGCCARTTTTCHARRCGC - 3'

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили с помощью дидезоксинуклеотидтрифосфатов по Сэнгеру.

Биоинформационный анализ. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов проводили с гомологичными последовательностями стандартных (референсных) штаммов *A. logei* ATCC29985^T, *A. fischeri* ATCC7744^T и *A. salmonicida* ATCC 43839^T. Корректировку сиквенсовых хроматограмм и их анализ проводили в программе Vector NTI 9. Сравнение результатов секвенирования и дифференциацию до вида проводили с помощью BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Для построения филогенетических деревьев использовали программу MEGA 5.2. Филогенетические деревья строились по методу Neighbor-Joining [Saitou et al., 1987; Tamura et al., 2007; Tamura et al., 2011], 1000 репликаций.

Биохимическое тестирование. Качественную реакцию восстановления нитратов определяли следующим образом. Культуру засевали в жидкой среде, содержащей 0,5% пептона и 0,2% нитрата калия. После суточного инкубирования при температуре 20 °С в суспензию добавляли 0,5 мл 0,8%-го раствора сульфаниловой кислоты в 5 Н уксусной кислоте и 9,5 мл 0,6%-го раствора α-нафтиламина в 5 Н уксусной кислоте (реактив Грисса). Появление красной окраски указывает на образование нитрита.

Результаты и обсуждение

С целью изучить возможное сезонное изменение состава кишечной микрофлоры рыб, обитающих в акваториях студёных морей, а также с целью провести поиск люминесцентных симбионтов и паразитов, в том числе возможных патогенов, проведён сбор образцов как свободноживущей пелагеальной микрофлоры, так и микрофлоры кишечников рыб в районах Белого, Берингова и Охотского морей в зимний период 2010 г. и летний период 2014 г.

В зимний период 2010 г. были изолированы 22 штамма морских психрофильных светящихся бактерий: два штамма (BM1, BM2) в акватории Белого моря, тринадцать штаммов (KCh1, NML, BML1–BML6, BML8, KAM1–KAM4) в акватории Охотского моря и семь штаммов (KCh2, KCh3, KCh5–KCh8) в акватории Берингова моря.

В летний период 2014 г. были собраны образцы микрофлоры кишечника у 200 рыб, выловленных из вод Охотского и Берингова морей. Собранные образцы, с целью обнаружить биолюминесцентные бактерии, высевали в чашки Петри с агаризованной средой SWT. На 99 чашках были выявлены колонии люминесцирующих микроорганизмов. В результате нескольких пассажей пересева отобранных колоний с применением чередования жидкой и агаризованной сред SWT удалось расчистить 25 изолятов.

В качестве контроля было отобрано семь биолюминесцирующих образцов кишечной микрофлоры рыб, выловленных в акваториях тёплых морей: SChm1, SChm2, SChm3, SChm4,

KChm1 (Чёрное море) и Chin2, Chin5 (Южно-Китайское море).

Из полученных за оба временных периода люминесцирующих изолятов выделили хромосомальную ДНК с целью последующего молекулярно-генетического анализа, включающего секвенирование гена 16S рРНК.

С целью идентифицировать полученные образцы с точностью до рода провели филогенетический анализ новых изолированных светящихся бактерий наряду с люминесцирующими психрофильными штаммами, имеющимися в распоряжении ВКПМ (рис. 1).

Оказалось, что образцы, собранные в зимний период, представлены большей частью видом *A. logei* (NML, NML2, BML1, BML3, BML6, BML8, KAM2, KCh1–KCh3, KCh5–KCh8, BM1, BM2), в то время как исследуемые штаммы, собранные в летний промежуток времени (148, 1417, 1432.2, 1437, 1439, 1445, 1448, 1449, 14100), принадлежат к виду *P. phosphoreum*. Принадлежность бактерий к указанным видам достоверно подтвердили данные мультигенного секвенирования, а также люминесцентные характеристики, ключевые биохимические параметры, интервалы температур, определяющие границы роста исследуемых бактерий.

Стоит отметить, что виды *A. logei* и *A. salmonicida* достаточно близки фенотипически. Основными биохимическими отличиями являются: свечение (*A. salmonicida* — криптически-люминесцирующие бактерии, т.е. светящиеся только при добавлении субстрата люцеферазы *n*-деканаля); наличие жёлтого пигмента (у *A. logei* он присутствует, у *A. salmonicida* — нет); способность восстанавливать нитрат; ферментация D-галактозы и мальтозы (бактерии у *A. logei* способны, *A. salmonicida* — нет). Штаммы KCh1–KCh3, KCh5–KCh8, BM1, BM2, NML, BML1, BML3, BML6, BML8, KAM2, KAM3 по биохимическом параметрам относятся к *A. logei*. Однако, при филогенетическом анализе на основе 5 «house-keeping»-генов штаммы NML и BM2 не кластеризуются с типовым штаммом *A. logei*. По результатам мультигенного анализа они ближе к виду *A. salmonicida*, чем *A. logei* (рис. 2).

Анализ последовательности «house-keeping»-генов показал отсутствие кластеризации

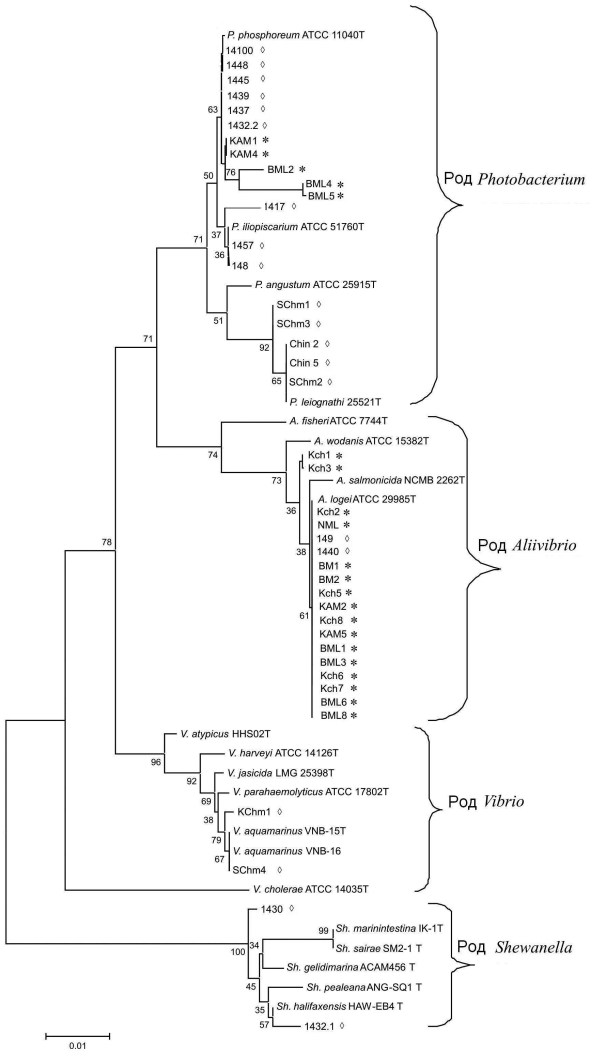

Рис. 1. Филогенетический анализ новых изолированных биолюминесцентных штаммов и референсных штаммов, построен на основе нуклеотидной последовательности 16S rRNA.
В зимний период 2010 г. выделены штаммы морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море у мыса Левашова: NML — навага; KCh1, BML1–BML6, BML8 — бычок; KAM1-4 — камбала; оз. Калагирь (восточное побережье Камчатки): KCh2, KCh3, KCh5–KCh8 — корюшка; в Белом море BM1, BM2 — керчак.
В летний период 2014 г. изолированы штаммы морских светящихся бактерий из кишечника рыб, пойманных в Охотском море у мыса Левашова: 148, 1430 — горбуша; 149, 1432.1, 1432.2, 1437, 1439 — навага; 1417 — кета; 1445 — камбала; 1448 — керчак; в Беринговом море: 1440 — керчак; 1457, 14100 — горбуша; в Чёрном море: SChm1, SChm2, SChm3, SChm4 — ставрида; KChm1 — керчак; в Южно-Китайском море у о. Хайнань: Chin2, Chin5, 1430 и 1432.1 — не люминесцируют.
* — штаммы, изолированные в зимний период;
◊ — штаммы, изолированные в летний период.

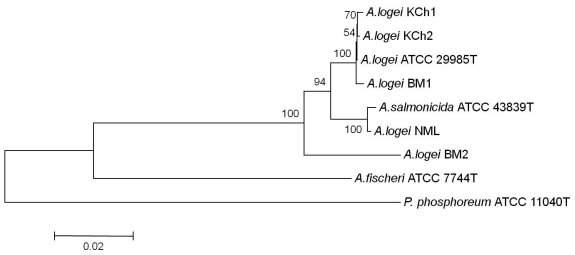

Рис. 2. Филогенетическое дерево, основанное на нуклеотидной последовательности пяти «house-keepeng»-генов (gapA, gyrB, pyrH, recA, rpoA) штаммов KCh1, KCh2, BM1, BM2, NML, *A. logei* ATCC 29985T, *A. salmonicida* ATCC 43839T, *A. fischeri* ATCC 7744T. *P. phosphoreum* ATCC 11040T взят для построения филогенетического дерева как представитель out-группы

для ряда штаммов, определённых по биохимическим параметрам как *A. logei*, с видом *A. logei* и близость их к виду *A. salmonicida*. Эти данные, по-видимому, указывают на необходимость проведения более углублённого анализа и реклассификации данных видов.

Выявленные виды бактерий — *A. logei* и *P. phosphoreum* — относятся к психрофилам. Мезофильные бактерии не обнаружены. Следует отметить, что для психрофильных бактерий *A. logei* характерна регуляция экспрессии генов системой «quorum-sensing» (QS) первого типа в зависимости от плотности популяции бактериальных клеток. В психрофильных бактериях *P. phosphoreum* такая система отсутствует. Можно предположить, что преимущественное преобладание микроорганизмов вида *A. logei* над *P. phosphoreum* в условиях более низких зимних температур обусловлено именно наличием системы QS, регулирующей экспрессию *lux*-оперона. Наличие *lux*-оперона вносит свой вклад при успешном заселении люминесцирующими бактериями животных-хозяев [Ruby, 1999]. Благодаря QS-регуляции бактерии имеют возможность скоординировано отвечать на изменения во внешней среде в зависимости от собственной плотности. Следует отметить особенности существования изолированных психрофильных микроорганизмов: так *P. phosphoreum* являются свободноживущими бактериями или консументами кишечника рыб, в то время как *A. logei* представляют собой симбионтов для ряда животных-хозяев [Ruby, 1999].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что имеет место видовое замещение бактерий в связи со сменой сезонной температуры поверхностных вод акваторий Берингова и Охотского морей: с повышением температуры летом бактерии *P. phosphoreum* вытесняют представителей *A. logei*, преобладающих в зимний период низких температур. Примечательно то, что оба вида бактерий принадлежат к психрофилам.

То, что из 200 отобранных образцов кишечной микрофлоры рыб из Охотского и Берингова морей каждый второй образец оказался биолюминесцирующим, демонстрирует факт, что светящиеся бактерии являются часто встречающимися типовыми обитателями микрофлоры рыб, причём нередко доминирующими в кишечнике.

Ранее была определена последовательность *lux*-оперона *A. logei* [Manukhov et al., 2011]. Структура *lux*-оперона содержит некодирующую область между генами *luxR1* и *luxC* (рис. 3,*а*). Данная область была использована для проведения филогенетического анализа близкородственных штаммов *A. logei* из Белого, Берингова и Охотского морей. С этой целью были подобраны праймеры (SV1dir и SV3rev) на основе регуляторного региона *luxR1—luxC*. Оказалось, что данный регион

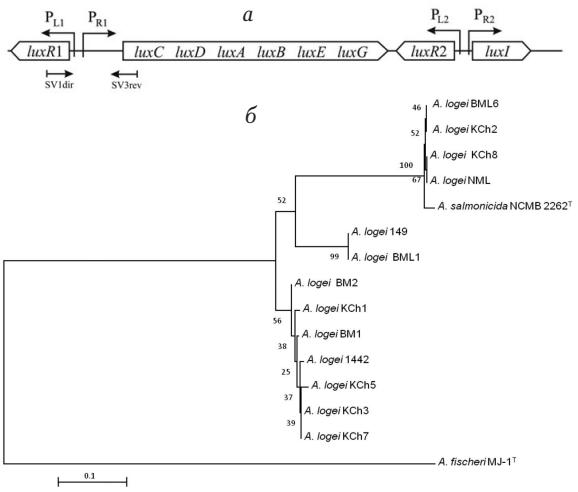

Рис. 3. Структура *lux*-оперона *A. logei* (*а*). Показано расположение *luxR1* и *luxR2* генов, Pr1 и Pr2 промоторов, а также праймеров SV1dir и SV3rev, с которых проводилось секвенирование luxR1—luxC-области. Филогенетический анализ исследуемых штаммов на основе нуклеотидных последовательностей регуляторной области *luxR1—luxC* (*б*)

lux-оперона, несмотря на то что фланкирован консервативными генами *luxR1* и *luxC*, является вариабельным даже для близкородственных штаммов.

Результат филогенетического анализа показал, что последовательности регуляторной *luxR1—luxC* области штаммов *A. logei*, изолированных из Белого и камчатских морей, не позволяют выделить отдельные кластеры, т.е. отсутствуют группы, специфичные для данных ареалов (рис. 3,*б*).

Заключение

Показано связанное с сезонными колебаниями температур морских поверхностных вод видовое замещение бактерий, заселяющих кишечник рыб Берингова и Охотского морей: бактерии *P. phosphoreum* в летний период замещают бактерии *A. logei*, преобладающие в зимний сезон низких температур, несмотря на то что оба вида относятся к психрофилам. Преобладание *A. logei*, по-видимому, обеспечено наличием QS-системы регуляции экспрессии генов *lux*-оперона, способствующей заселению органов животного-хозяина. Свободноживущие *P. phosphoreum*, не обладающие этой системой, в холодные сезоны года, очевидно, менее приспособлены к колонизации кишечника рыб. Следует, однако, отметить, что разница в микрофлоре может быть следствием не сезонных, а иных временных циклов, так как зимние и летние образцы собраны с разницей в несколько лет (2010 и 2014 гг.).

Психрофильные светящиеся бактерии являются часто встречающимися, порой доминирующими, в составе кишечной микрофлоры рыб, обитающих в акваториях студёных морей.

Анализ последовательности «house-keeping» -генов двух штаммов, определённых по биохимическим параметрам как *A. logei*, показал близость данных штаммов к виду *A. salmonicida*. Расхождение данных биохимического и филогенетического анализа последовательностей «house-keeping»-генов для ряда биолюминесцирующих штаммов свидетельствует о необходимости видовой реклассификации.

Показана вариабельность некодирующей области между консервативными генами *luxR1* и *luxC*, содержащейся в структуре *lux*-оперона *A. logei*. По-видимому, вариабельность этого участка связана со сравнительно недавней утратой способности к экспрессии гена *luxI* в данном месте *lux*-оперона у видов *A. logei* и *A. salmonicida*. В настоящее время мы являемся свидетелями постепенной потери бактериями *A. logei* и *A. salmonicida* данного некодирующего фрагмента *lux*-оперона в процессе эволюции.

Литература

Bang S.S., Baumann P., Nealson K.H. 1978. Phenotypic characterization of Photobacterium logei (sp. nov.), a species related to *P. fischeri*. Curr. // Microbiol. V. 1. P. 285—288.

Beaz-Hidalgo R., Doce A., Balboa S., Barja J.L., Romalde J.L. 2010. *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov., isolated from Manila clam, Ruditapes philippinarum and emended description of the genus *Aliivibrio* // International Journal of Systematic and Microbiology. V. 60. P. 223—228.

D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life // EMBO Rep. V. 7. P. 385—389.

Deming J.W. 2002. Psychrophiles and Polar Regions // Curr. Opin. Microbiol. V. 5. P. 301—309.

Engebrecht J., Silverman M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 81. P. 4154—4158.

Manukhov I.V., Khrul'nova S.A., Baranova A., Zavilgelsky G.B. 2011. Comparative analysis of the *lux*-operons in *Aliivibrio logei* KCh1 (Kamchatka isolate) and *Aliivibrio salmonicida* // Journal of Bacteriol. V. 193. N 15. P. 3998—4001.

Nealson K.H., Hastings J.W. 2006. Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas // Appl. Environ. Microbiol. V. 72 (4). P. 2295—2297.

Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. 1999. Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri* // Trends Microbiol. V. 10. P. 414—420.

Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. V. 4. P. 406—425.

Stevens A.M., Greenberg E.P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes // J. Bacteriol. V. 179 (2). P. 557—562.

Swartzman E., Kapoor S., Graham A.F., Meighen E.A. 1990. A new Vibrio fischeri lux-gene precedes a bidirectional termination site for the *lux*-operon // J. Bacteriol. V. 172. P. 6797—6802.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. V. 24. P. 1596—1599.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Ge-

ry Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol. Biol. Evol. V. 28. P. 2731–2739.

Urbanczyk H., Ast J.C., Higgins M.J., Carson J., Dunlap P.V. 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov., and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 57. P. 2823–2829.

Поступила в редакцию 30.06.2015 г. *Принята после рецензии 25.08.2015 г.*

Analysis of luminescent intestinal microflora of fish in cold seas: the White, Bering and Okhotsk Seas

M.N. Konopleva[1], S.A. Khrul'nova[2], M.S. Osetrova[1, 2], D.I. Degtev[1, 2], I.V. Manukhov[1, 2], G.B. Zavilgelsky[2]

[1] Moscow Institute of Physics and Technology (Dolgoprudny)

[2] Reserch Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (Moscow)

The present study investigates the species composition of luminescent bacteria that live in the intestinal tract of fish in cold sea waters in summer and winter. Samples were collected during two expeditions — winter 2010 and summer 2014 — in order to study the possibility of seasonal changes in the composition of intestinal microflora or free-living pelagic flora. To conduct the search of fluorescent symbionts and parasites, including potential pathogens, samples were collected from fish of the White, Bering and Okhotsk seas. The result of the expedition was the allocation of 21 winter strains of luminescent bacteria and 25 ones in summer samples. Species replacement of bacteria inhabiting the intestines of fish from the Bering and Okhotsk seas was demonstrated. It was probably associated with seasonal fluctuations in temperature of the sea surface waters: in summer *P. phosphoreum* bacteria species displace other bacteria and *A. logei* were prevailing in the winter cold. It is remarkable that both species belong to psychrophilic. Presence of psychrophilic luminescent bacteria in intestinal microflora of fish found in the waters of icy seas is frequent, sometimes dominant. Sequence analysis of «house-keeping» genes of two strains identified as *A. logei* by their biochemical parameters, these strains showed proximity to the species *A. salmonicida*. This inconsistency between data of biochemical and phylogenetic analysis for a number of bioluminescent strains demonstrates the need for reclassification of the species. The variability of non-coding region between conservative genes *luxR1* and *luxC*, contained in the structure of the *lux*-operon of *A. logei* was shown. Apparently, the variability of that area connected with the relatively recent loss of ability to express *luxI* gene, which residues are present in the area of *luxR1-luxC lux*-operon.

Key words: *Aliivibrio logei*, *Photobacterium phosphoreum*, bioluminescence, *lux*-operon, psychrophilic bacteria, bioluminescence, species composition, the White Sea, the Sea of Okhotsk, the Bering Sea, seasonal changes in the microflora.