

20. Karuppiyah V., Alagappan K., Li Zh. Coral Holobiont Omics: Microbes and Dinoflagellates. *In: Marine OMICS: Principles and Applications* (Ed. Se-Kwon Kim). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2016, 8:133-163.
21. Kouzuma A., Watanabe K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015, 33: 125-129.
22. Krohn-Molt I., Wemheuer B., Alawi M. et al. Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial—algal interactions in photobioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79(20): 6196-6206.
23. Lakaniemia A.-M., Hulatt C. J., Wakeman K. D. et al. Eukaryotic and prokaryotic microbial communities during microalgal biomass production. *Bioresource Technology*. 2012, 124: 387-393.
24. *Microbiota of the Human Body, Advances in Experimental Medicine and Biology*. (Ed. A. Schwiertz). Switzerland: Springer International Publishing, 2016.
25. Natrah F.M., Bossier P., Sorgeloos P. et al. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Rev. Aquaculture*. 2013, 6: 48-61.
26. Papone T., Kookkhunthod S., Leasing R. Microbial oil production by monoculture and mixed cultures of microalgae and oleaginous yeasts using sugarcane juice as substrate. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 2012, 64: 1127-1131.
27. Ramanan R., Kim B.H., Cho D.H. et al. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* 2016. 34 (1): 14-29.
28. Rosenberg E., Zilber-Rosenberg I. Symbiosis and Development: The Hologenome Concept. *Birth Defects Research (Part C)*. 2011, 93: 56-66.
29. Santos C. A., Reis A. Microalgal symbiosis in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98 (13): 5839-5846.
30. Sule P., Belas R.A. Novel Inducer of *Roseobacter* Motility Is Also a Disruptor of Algal Symbiosis. *J. Bacteriol.* 2013, 195 (4): 637-646.
31. Takemura A.F., Chien D.M., Polz M.F. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol.* 2014, 5 (38): 1-26.
32. Tate J. J., Gutierrez-Wing M. T., Rusch K. A. et al. The Effects of Plant Growth Substances and Mixed Cultures on Growth and Metabolite Production of Green Algae *Chlorella* sp. *J. Plant Growth Regulation*. 2013, 32 (2): 417-428.
33. Yan N., Fan C., Chen Y. et al. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17 (6): 962-986.
34. Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32 (5): 723-735.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.А.Селиванова¹, Ю.А.Хлопко¹, Н.Е.Гоголева^{2,3}, А.О.Плотников¹

ДЕТЕКЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ В СОЛОНОВАТЫХ РЕКАХ ПРИЭЛЬТОНЬЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Казанский институт биохимии и биофизики; ³ Казанский (Приволжский) федеральный университет

Цель. Выявить потенциально патогенных бактерий в планктоне солоноватых рек Приэльтонья методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК. *Материалы и методы.* Образцы воды из солоноватых рек Ланцуг и Чернавка, впадающих в озеро Эльтон, отбирали в объеме 50 мл, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Тотальную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной гомогенизацией и ферментативным лизисом. ДНК-библиотеки для секвенирования создавали по протоколу Illumina с праймерами к варибельному участку V3—V4 гена 16S рРНК. Секвенирование проводили на платформе MiSeq («Illumina», США). *Результаты.* В планктонных образцах солоноватых рек Приэльтонья были обнаружены филоциты потенциально патогенных бактерий филума *Proteobacteria* из семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Campylobacteraceae*,

Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Moraxellaceae, Legionellaceae, Alcaligenaceae, Campylobacteraceae, а также филумов Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria. Вероятным источником бактериального загрязнения является крупный и мелкий рогатый скот. *Заключение.* Полученные данные демонстрируют, что солоноватые континентальные водоемы наряду с пресными и морскими выполняют резервуарную функцию для потенциально патогенных микроорганизмов. Высокопроизводительное секвенирование может быть использовано для скрининговой оценки присутствия патогенов в воде.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 87—95

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, солоноватые водоемы, потенциально патогенные микроорганизмы, антропогенная нагрузка, бактериопланктон, санитарное состояние

*E.A.Selivanova*¹, *Yu.A.Khlopko*¹, *N.E.Gogoleva*^{2,3}, *A.O.Plotnikov*¹

DETECTION OF POTENTIALLY PATHOGENIC BACTERIA IN THE BRACKISH RIVERS FLOWING INTO THE ELTON LAKE BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics; ³Kazan Federal University, Russia

Aim. To indicate potentially pathogenic bacteria in plankton of the brackish rivers flowing into the Elton Lake by high-throughput sequencing of 16S ssuRNA gene. *Materials and methods.* The water samples from brackish rivers Lantsug and Chernavka, flowing into the Elton Lake, were taken up in a volume of 50 ml, filtered through membrane filters (pore diameter — 0.22 µm). Total DNA was obtained by phenol-chloroform extraction with preliminary homogenization and enzymatic lysis. DNA libraries for sequencing were created by protocol Illumina with primers to a variable V3—V4 region of 16S ssuRNA gene. Sequencing was performed on a platform MiSeq («Illumina», США). *Results.* There were found the phylotypes of potentially pathogenic bacteria of *Proteobacteria* phylum from the families *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Campylobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Legionellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Campylobacteraceae*, and also of *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* phyla in the plankton samples of the brackish rivers. Probable source of bacterial contamination is large and small cattle. *Conclusion.* These data demonstrate that the continental brackish waters, along with freshwater and marine habitats perform a reservoir function to potentially pathogenic microorganisms. High-throughput sequencing can be used to screen the presence of pathogens in water.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 87—95

Key words: high-throughput sequencing, brackish water bodies, potentially pathogenic bacteria, anthropogenic load, bacterioplankton, sanitary condition

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенные и условно патогенные бактерии могут длительно персистировать в водных экосистемах, используя стратегии выживания, в основе которых лежит индивидуальный ответ бактериальных клеток на стресс или популяционная перестройка (адсорбция к частицам осадка, формирование биопленок или персистенция в организме гидробионтов). Многие виды бактерий способны длительно сохраняться в ассоциациях с простейшими [4]. Способствует сохранению патогенных микроорганизмов и их переходу из покоящегося в вирулентное состояние цветение микроводорослей в водоеме [15].

Существует более 100 признанных видов патогенных микроорганизмов, которые можно обнаружить в загрязненной воде рекреационного и питьевого назначения [15]. Несмотря на постоянные усилия по обеспечению безопасности воды, вспышки инфекций, связанных с передачей через воду, по-прежнему регистрируются по всему миру. Известна возможность передачи водным путем бактерий *Salmonella* и *Campylobacter* — частых возбудителей гастроэнтеритов, а также *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Yersinia*. Подробно изучена роль водной среды в передаче и распространении *Legionella pneumophila*, способной персистировать внутри клеток простейших. Список патогенных и условно патогенных микроорганизмов, для которых вода является вероятным фактором передачи, продолжает расширяться.

Морские водоемы, имеющие рекреационное значение, наряду с питьевыми источниками и морепродуктами являются важным фактором передачи инфекций водным путем. Примером могут быть случаи цистита, вызванного *Vibrio cholerae* не O1, у купающихся, тяжелой раневой инфекции, осложнившейся остеомиелитом, септициемией, поражением центральной нервной системы и эндометрита, возбудителем которых явился *Vibrio alginolyticus* из морской воды, а также гангрена и сепсис, вызванные *Vibrio parahaemolyticus* [13]. Значение континентальных соленых и солоноватых водоемов как резервуара для потенциально патогенных микроорганизмов изучено в меньшей степени, хотя многие из подобных водоемов активно используются в качестве курортной базы.

Последние публикации свидетельствуют о необходимости усиления мониторинга микробных агентов в водоемах для повышения возможностей раннего предупреждения и профилактики вспышек инфекционных заболеваний с водным путем передачи, особенно в условиях глобальных изменений климата [14].

Культуральные методы могут существенно недооценить присутствие патогенных бактерий в воде вследствие перехода жизнеспособных бактерий в некультивируемое состояние. Поэтому разрабатываются методы прямой детекции патогенов в образцах с использованием молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР, мультиплекс-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, FISH-гибридизация, пиросеквенирование, технологии на основе микрочипов, которые позволяют осуществлять прямую детекцию определенных патогенов, идентифицировать, генотипировать, определять численность и жизнеспособность патогенных бактерий, вирусов и простейших, отслеживать источники загрязнения [5]. Использование современных молекулярно-генетических технологий важно для выявления источников загрязнений, устранения путей передачи инфекций и более реалистичной оценки уровня риска для здоровья населения. Среди таких методов одним из наиболее точных и перспективных является метагеномный анализ микробных популяций, который позволяет провести тотальную оценку состава микробного сообщества, выявив потенциально патогенные виды, включая некультивируемые формы.

Целью данной работы является детекция потенциально патогенных бактерий в планктоне солоноватых рек Приэльтона методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы воды из рек Чернавка и Ланцуг, впадающих в озеро Эльтон (Волгоградская область), были отобраны в августе 2015 г. Минерализация воды в среднем течении рек Ланцуг и Чернавка составляла 21 и 24 ‰ соответственно. Образцы объемом 50 мл фильтровали через мембранные фильтры с

диаметром пор 0,22 мкм. Тотальную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной гомогенизацией и ферментативным лизисом. Для исключения возможной контаминации на этапе пробоподготовки использовали отрицательный контроль. Чистоту ДНК контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и фотометрии на приборе NanoDrop 8000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). ДНК-библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу Illumina с праймерами к варибельному участку V3-V4 гена 16S рРНК S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013). Секвенирование проводили на платформе MiSeq («Illumina», США) с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit V3 PE600 в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

Данные секвенирования обрабатывали комплексом биоинформационных программ USEARCH v8.0.1623_win32 [2], включая слияние парных ридов, фильтрацию ридов по качеству и длине (минимальный размер — 300 bp), удаление химер, даблтонов и синглтонов, кластеризацию ридов в ОТЕ на уровне сходства 97%. Таксономическую классификацию ОТЕ проводили с использованием интерактивного инструмента VAMPS с использованием базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Некоторые ОТЕ выравнивали с использованием алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на базу данных нуклеотидных последовательностей nr/nt (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК изучен таксономический состав прокариот и проанализировано присутствие потенциально патогенных микроорганизмов (табл.) в планктоне двух солоноватых рек Ланцуг и Чернавка, впадающих в озеро Эльгон (Волгоградская область). Эти реки находятся на территории природного парка Эльгонский, что обуславливает минимальную антропогенную нагрузку. Однако в среднем течении р. Ланцуг проводится выпас крупного и мелкого рогатого скота.

В библиотеках исследованных образцов большинство флотипов потенциально патогенных бактерий относилось к филуму Proteobacteria. В образце из реки Ланцуг среди ОТЕ, относящихся к семейству Enterobacteriaceae, присутствовали *Pantoea vagans*, *Serratia* spp., *Rahnella aquatilis*, а в образце из реки Чернавка — *Escherichia coli*, *Providencia* spp., *Morganella morganii* и неидентифицированные представители семейства Enterobacteriaceae. Широко было представлено семейство Vibrionaceae, к которому относился 31 флотип из библиотеки образца р. Чернавки и 13 флотипов из р. Ланцуг, среди них большую часть составлял род *Vibrio* (24 и 10 ОТЕ соответственно), что объяснимо широким распространением галофильных видов вибрионов в природных водоемах. Наряду с видами, характерными для морской воды (*V. kanaloae*), морских беспозвоночных (*V. tritonius*) и рыб (*V. anguillarum*), были выявлены флотипы, близкие к патогенным для человека *V. cholerae* O1 biovar El Tor и *V. alginolyticus* (возбудители гастроэнтеритов и раневой инфекции). Семейство Pseudomonadaceae было представлено 2 ОТЕ в образце р. Чернавка и 15 в образце р. Ланцуг, из которых 10 относились к роду *Pseudomonas*. Среди них присутствовали ОТЕ, принадлежащие к условно патогенным видам *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas stutzeri*. Семейство Moraxellaceae было представлено в образце р. Ланцуг 10 ОТЕ, относящимися-

Последовательности фрагментов гена 16S рРНК потенциально патогенных бактерий в планктонных образцах солоноватых рек Ланцуг и Чернавка

Филогенетическое положение	ОТЕ (L-Ланцуг, Ch- Чернавка)	Ближайший культивируемый гомолог в базе данных GenBank (NCBI) (видовое название) (Ac. №)	Сходство с гомологом (%)	Источник выделения
Proteobacteria	L-359	<i>Pantoea vagans</i> (CP014129.2)	99	рана человека
Enterobacteriaceae	L-2447	<i>Serratia</i> spp. ATCC 39006 (CP025084.1)	99	солончак, Нью-Джерси, США
	L-3018	<i>Enterobacter tabaci</i> (MH005094.1)	99	водоем
		<i>Enterobacter cloacae</i> (CP026975.1)	99	прямая кишка человека
	L-1692	<i>Rahnella aquatilis</i> (LC191553.1)	99	не указан
	L-639	<i>Serratia marcescens</i> (CP026702.1)	99	не указан
	L-4214	<i>Enterobacter</i> spp. (KR189508.1)	98	водоем
		<i>Klebsiella aerogenes</i> (CP026756.1)	98	не указан
	Ch-1401	<i>Escherichia coli</i> (LC144553.1)	99	р. Махананда в Индии
	Ch-1145	<i>Providencia vermicola</i> (KT325058.1)	99	с/х почва
		<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 29944 (FJ971874.1)	99	пациент с оппортунистической инфекцией
	Ch-2213	<i>Morganella morganii</i> (KR610526.1)	99	кишечник <i>Drosophila melanogaster</i>
Proteobacteria	L- 77	<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 33868 (CP014053)	99	морская вода
Vibrionaceae	L- 91	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor (CP026647.1)	99	пациент, больной холерой
Proteobacteria	L- 381	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MG546221.1)	99	не указан
Pseudomonadaceae		<i>Pseudomonas resinovorans</i> (KT204486.1)	99	загрязненная нефтяными продуктами почва
	L-301	<i>Pseudomonas</i> sp. (HM038236.1)	99	экскременты носорога
	Ch-3149	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (KY643712.1)	99	ризосфера
		<i>Pseudomonas xanthomarina</i> (KY617784.1)	99	компост из навоза свиней
Proteobacteria	L-187	<i>Acinetobacter</i> spp. (KT372439.1)	99	компост
		<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 17925 (U10875.1)	98	не указан
Moraxellaceae	L-3658	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MF372965.1)	98	вода
	L-1863	<i>Acinetobacter schindleri</i> (KY616647.1)	97	свежий навоз
	L-875	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> (KM114925.1)	99	кожа жаб и лягушек
	Ch -42-166	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (LN774707.1)	99	образец воздуха в туристической пещере
	Ch -1898	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (KY616668.1)	99	дренажная вода
	Ch -4345	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KC305040.1)	93	госпитальный штамм
	L-1321	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> (NR_115179.1)	96	пациент с абсцессом околоушной железы
Proteobacteria	Ch -1880	<i>Aeromonas diversa</i> (KU991519.1)	99	поверхностный водоем
Aeromonadaceae	L-738	<i>Aeromonas intestinalis</i> (LT630759.1)	99	фекалии человека
Proteobacteria	L-218	<i>Legionella donaldsonii</i> (KM504126.1)	99	пациент с раком
	L-1701	<i>Legionella pneumophila</i> (LT906452.1)	96	легкие человека
	L-3825	<i>Legionella pneumophila</i> OLDA (CP016030.2)	97	пациент, больной легионеллезом
Proteobacteria	Ch -380	<i>Francisella philomiragia</i> (KU593488.1)	99	пациент
Francisellaceae				
Proteobacteria	L-646	<i>Alcaligenes</i> sp. (AJ133493.2)	99	пациент с септическим артритом
	L-2867	<i>Achromobacter pulmonis</i> (KP318449.1)	99	нематоды
	L-30	<i>Bordetella</i> spp. (KF851340.1)	98	поверхностные морские воды
	Ch -90		99	
Proteobacteria	L-66	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (KT225286)	98	содержимое матки коровы
Campylobacteraceae	L-486	<i>Arcobacter defluvii</i> (MG195894.1)	99	дренажная вода
	L-2265	<i>Arcobacter</i> spp. (LT629995.1)	98	сточные воды
	L-627	<i>Arcobacter skirrowii</i> (MG195899.1)	99	канал, загрязненный городскими сточными водами
	Ch -54	<i>Arcobacter bivalviorum</i> (MF155896.1)	99	моллюски
Firmicutes	L-157	<i>Staphylococcus equorum</i> (MG937677.1)	99	кожа здоровых лошадей
Staphylococcaceae				
Firmicutes	L-2306	<i>Enterococcus</i> spp. MF134667.1	99	кишечник червя
		<i>Enterococcus gallinarum</i> (CP014067.2)	99	локтевая ямка человека
Bacteroidaceae	L-1019	<i>Bacteroides ihuae</i> (NR_147391.1)	98	мокрота человека
Bacteroidetes				
Actinobacteria	L-3759	<i>Mycobacterium paraense</i> (KJ949001.1)	98	легкие человека
Mycobacteriaceae				

ся к родам *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Psychrobacter*, в р. Чернавка — 3 ОТЕ рода *Acinetobacter*. Наряду с повсеместной распространенностью этих свободно живущих сапрофитов, среди них выявлены представители, способные вызывать оппортунистические инфекции: *Acinetobacter lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. schindleri*, *A. beijerinckii*, *A. calcoaceticus*, *Alkanindiges hongkongensis*. Внутри семейства *Aeromonadaceae* были обнаружены ОТЕ, близкие к *Aeromonas intestinalis*, выделенному у пациента с гастроэнтеритом [3] и *A. diversa*, выделенному из гнойной раны [9].

В образце из р. Чернавка было обнаружено 12 ОТЕ неидентифицированных представителей семейства *Legionellaceae*, в образце р. Ланцуг — 3 ОТЕ, две из которых были отнесены к хорошо известному патогенному виду рода *Legionella* — *L. pneumophila*, вызывающему тяжелую пневмонию, и один — к *L. donaldsonii*, для которого недавно была описана способность вызывать пневмонию у пациентов с онкологическими заболеваниями [6]. Эта находка интересна, поскольку об обнаружении этих микроорганизмов в морских водоемах имеются лишь единичные данные, и традиционно считается, что легионеллы не способны к выживанию и персистенции в соленых водоемах. Вероятно, сохранению легионелл способствует персистенция внутри клеток галофильных протистов, способствующая увеличению их вирулентности [4].

Семейство *Francisellaceae* было представлено 4 ОТЕ в р. Чернавка, из которых одна была идентифицирована как *Francisella philomiragia* — патогенный для человека вид, и 1 ОТЕ в р. Ланцуг идентифицирована как *F. endociliophora* (симбионт морской инфузории)

Семейство *Alcaligenaceae* было представлено в р. Ланцуг 9 ОТЕ, относительное обилие которых составило 1,16% от общей численности ридов. Среди них были обнаружены флотипы *Alcaligenes* spp., *Achromobacter pulmonis*, которые широко распространены в объектах окружающей среды, но могут вызывать оппортунистические инфекции у людей. В образцах обеих рек также зарегистрировано присутствие неидентифицированных до вида бактерий рода *Bordetella*, лишь отдельные представители которого, например *Bordetella petrii*, обитают во внешней среде.

Семейство *Campylobacteraceae*, самое крупное и наиболее разнообразное среди класса *Epsilonproteobacteria*, составляло значительную долю среди всех ОТЕ образцов. Среди них обнаруживались представители непатогенного рода *Sulfurospirillum* и малоизученного рода *Argobacter*, среди представителей которого описаны виды, способные вызывать заболевания человека. К роду *Argobacter* было отнесено 28 ОТЕ из образца р. Чернавка (8,91%), 20 — из образца р. Ланцуг (1,83%). Несмотря на высокие показатели относительного обилия, потенциально патогенных видов в Чернавке выявлено не было, в основном это были азотфиксирующие *A. nitrofigilis* и другие свободноживущие представители морского бактериопланктона. Единственный вид, о патогенности которого нет данных — это выделенный ранее из моллюсков *A. bivalviorum*. Напротив, в реке Ланцуг были выделены ОТЕ, наиболее сходные с *A. cyaerophilus* и *A. skirrowii*, способными вызывать развитие инфекционного процесса у человека и животных (энтерит, бактериемия) и флотип *A. defluvii*, выделявшийся ранее из сточных вод [7].

Среди филума *Firmicutes* также были обнаружены условно патогенные представители. Так, в образце из р. Ланцуг были выявлены флотипы *Enterococcus* spp. и *Staphylococcus equorum*, вида, который является пред-

ставителем нормофлоры и обладает низкой вирулентностью, однако описаны случаи его выделения из клинических образцов как животных, так и человека [11]. Кроме того, среди фирмикут были разнообразно представлены флотипы, относящиеся к семействам *Lachnospiraceae* (роды *Roseburia*, *Cellulosilyticum*, *Blautia* и др.), *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, которые, по данным метагеномных исследований, составляют большую долю кишечного микробиома млекопитающих [12]. Большинство из этих последовательностей не были идентифицированы. Важно отметить, что семейство *Lachnospiraceae* некоторыми исследователями предлагается в качестве альтернативного индикатора фекального загрязнения воды. Также в образцах обнаруживались единичные ОТЕ, принадлежащие к семействам *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, представители которых присутствуют в микробиоме кишечника, что может свидетельствовать о фекальном загрязнении исследуемых рек Приэльтонья.

Среди представителей филума *Bacteroidetes* были выявлены флотипы, принадлежащие к роду *Bacteroides* (6 ОТЕ — в р. Ланцуг, 7 ОТЕ — в р. Чернавка), которые наряду с обитанием в кишечнике могут выступать в качестве этиологического фактора «анаэробных» инфекций и также рассматриваются как возможный индикатор фекального загрязнения. Среди *Actinobacteria* был зарегистрирован флотип, близкий к *Mycobacterium paraense*, выделенной из образца легких.

Обращает на себя внимание присутствие большого числа флотипов, являющихся симбионтами простейших, таких как бактерии родов *Polynucleobacter*, *Neochlamydia*, *Parachlamydia*, семейства *Rickettsiaceae* и др., что свидетельствует о хороших условиях для формирования симбиотических связей между простейшими и бактериями в солоноватых континентальных водоемах и, возможно, о существенной роли протистов в персистенции патогенных и условно патогенных бактерий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных позволил выявить в планктоне солоноватых рек Приэльтонья бактерий организменного происхождения, в том числе и потенциально патогенных. Обнаруженные флотипы согласуются с многочисленными публикациями о регистрации патогенных микроорганизмов в морской воде, таких как *Vibrio* (нетоксигенные *V. cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* и др.) [10], *Staphylococcus aureus* [8], псевдомонады и *Escherichia coli* [1].

Вероятным источником бактериального загрязнения солоноватых рек Приэльтонья является крупный и мелкий рогатый скот, о чем свидетельствует обнаружение в большом количестве в планктонных образцах представителей семейств *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, порядка *Bacteroidales*, составляющих большую долю нормальной микрофлоры кишечника, а также представителей рода *Arcobacter*, поражающих домашних животных и вызывающих диарею у людей, для которых была показана возможность водного пути передачи [5]. Вероятно, данные микроорганизмы попадают в воду непосредственно при выпасе скота, как наблюдается в среднем течении р. Ланцуг, или за счет дождевых стоков с прилегающих территорий, как происходит в реке Чернавка. Полученные результаты демонстрируют, что соленые континен-

тальные водоемы, наряду с пресными и морскими, выполняют резервуарную функцию для потенциально патогенных микроорганизмов. Рекреационное значение подобных водоемов и частое использование как курортной базы делает необходимым мониторинг их экологического и санитарного состояния.

Применение метода высокопроизводительного секвенирования открывает широкие возможности для преодоления существующих ограничений традиционных методов оценки микробиологической безопасности водных источников. Метод позволяет осуществлять прямую детекцию патогенов в образце, а не судить косвенно о возможном их присутствии по индикаторным видам; может применяться к образцам из самых различных объектов; позволяет обнаружить некультивируемые микроорганизмы и получить информацию о новых, неизученных или малоизученных видах, в том числе и патогенных. Все эти достоинства делают перспективным использование методов высокопроизводительного секвенирования для скрининговых исследований с целью оценки спектра потенциально патогенных микроорганизмов в водоеме. Однако, несмотря на преимущества, метод имеет ряд существенных недостатков и ограничений, так как обнаружение ДНК микроорганизмов не дает информации об их жизнеспособности, вирулентности и абсолютном содержании, а соответственно степени риска для населения. Длина последовательностей, расшифровать которые можно на платформе MiSeq, ограничена 550 н.п., что делает затруднительной идентификацию на уровне вида. Таким образом, необходимо совершенствование методических подходов к оценке качества воды, в том числе и в континентальных солоноватых водоемах, и расширение данных о микробном составе микроорганизмов различных биотопов с целью разработки алгоритмов оценки рисков здоровью человека из-за наличия патогенов в воде.

Работа выполнена в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбурге) и частично поддержана грантами РФФИ №№ 16-44-560316 и 17-04-00135.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davies C.M., Long J.A.H., Donald M., Ashbolt N.J. Survival of Fecal Microorganisms in Marine and Freshwater Sediments. *Appl. Env. Microbiology*. 1995, 61 (5):1888-1896.
2. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010, 26 (19): 2460-2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
3. Figueras M. J., Latif-Eugenн F., Ballester F. et al. *Aeromonas intestinalis* and *Aeromonas enterica* isolated from human faeces, *Aeromonas crassostreae* from oyster and *Aeromonas aquatilis* isolated from lake water represent novel species. *New Microbe and New Infect.* 2017, 15: 74-76.
4. Gast R.J., Moran D.M., Dennett M.R. et al. Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. *J. Water Health*. 2011, 9(1): 37-52.
5. Girones R., Ferrus M.A., Alonso J.L. et al. Molecular detection of pathogens in water. The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*. 2010, 44: 4325-4339.
6. Han X.Y., Ihegword A., Evans S.E. et al. Microbiological and Clinical Studies of Legionellosis in 33 Patients with Cancer. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (7): 2180-2187.
7. Lastovica A.J., On S.L.W., Zhang L. The Family Campylobacteraceae. In: Rosenberg E. et al. (Ed.). *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.
8. Levin-Edens E., Bonilla N., Meschke J. Scott et al. Survival of environmental and clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in marine and fresh waters. *Water Research*. 2011, 45: 5681-5686.
9. Micana-Galbis D., Farfón M., Gaspar Lorén J. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Systematic Applied Microbiology*. 2010, 33: 15-19.

10. Ng C., Goh S.G., Saeidi N. et al. Occurrence of *Vibrio* species, beta-lactam resistant *Vibrio* species, and indicator bacteria in ballast and port waters of a tropical harbor. *Science of the Total Environment*. 2018, 610-611: 651-656.
11. Nováková D., Sedláček I., Pantucek R. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *J. Medical Microbiology*. 2006, 55: 523-528.
12. Rajilić-Stojanović M., de Vos W.M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 2014, 38 (5): 996-1047.
13. Ramnrez-Castillo F.Y., Loera-Muro A., Jacques M. et al. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. 2015, 4: 307-334.
14. Robins P.E., Skov M.W., Lewis Matt J. et al. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. *Estuarine Coastal Shelf Science*. 2016, 169: 119-135.
15. Rose J.B., Epstein P.R., Lipp E.K. et al. Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Water and Foodborne Diseases Caused by Microbiologic Agents. *Environmental Health Perspectives*. 2001, 109 (suppl. 2): 211-221.

© Т.Н.ЯЦЕНКО-СТЕПАНОВА, М.Е.ИГНАТЕНКО, 2018

Т.Н.Яценко-Степанова, М.Е.Игнатенко

ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫЕ ЦАНОБАКТЕРИЯ ЛЕЧЕБНЫХ ГРЯЗЕЙ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Цель. Определение видового состава *Cyanobacteria* грязе-рапного участка реки Тузлукколь и выявление потенциально опасных представителей данной группы микроорганизмов. *Материалы и методы.* Исследовано 270 образцов (из них 135 количественные), отобранных в весенне-осенний период 2012-2017 гг. в соответствии с общепринятыми методиками. Идентификацию цианобактерий проводили согласно определителям отечественных и зарубежных авторов, для подсчета численности использовали камеру Нажотта объемом 0,01 см³, биомассу определяли расчетно-объемным методом. *Результаты.* Выявлено 25 видов, разновидностей и форм *Cyanobacteria*. Четыре рода (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia* и *Lyngbya*) — потенциально способны продуцировать гепато-, нейро- и дерматотоксины. Общее количество цианобактерий в отдельные периоды превышало показатели, рекомендованные ВОЗ в водах для купания почти в 5 раз. *Заключение.* Результаты исследования доказывают необходимость систематического контроля *Cyanobacteria* (видовой состав и количественное развитие), без которого используемый населением в бальнеологических целях грязе-рапный участок не может считаться безопасным для здоровья людей.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 95—100

Ключевые слова: *Cyanobacteria*, токсины, автотрофные микроорганизмы, минерализация

T.N.Yatsenko-Stepanova, M.E.Ignatenko

POTENTIALLY DANGEROUS *CYANOBACTERIA* OF THERAPEUTIC MUD

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Aim. Determination of *Cyanobacteria* species composition in the Tuzlukkol River part with mud and brine and identification of potentially dangerous representatives of this group of microorganisms. *Materials and methods.* 270 samples were analyzed (135 of them — quantitatively), selected in the spring-autumn periods 2012-2017 in accordance with generally accepted methods. Identification of cyanobacteria was carried out according to the algae identification guides of domestic and foreign authors, the chamber of Najotta with a volume of 0.01 cm³ was used to calculate the algae quantity. The algae biomass was calculated taking into account the