

УДК: 564.6:579.842

«Вибрион Фишера (*Vibrio fischeri*) как модельный объект»

Соколова А.В., Насакина А.Э., Черникова Е.А.

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава Российской Федерации - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки "Биология", Россия, Волгоград, e-mail: sokolooovaaaa@yandex.ru

Аннотация

Рассматривается Вибрион Фишера в качестве модельного объекта для экспериментов в области генетики и медицины; рассмотрена основная информация о бактерии Фишера, особенности генома; симбиотические отношения с гавайским кальмаром; рассмотрено строение и функционирование lux-оперона. Определены основные питательные среды, используемые для разведения описанной бактерии. Выделены основные качества вибриона Фишера, благодаря чему бактерия остается востребованной в качестве модельного организма.

Ключевые слова: вибрион Фишера, биолюминесценция, оперон lux, гавайский кальмар, симбиоз, чувство кворума.

Vibrio fischeri (*Vibrio fischeri*) as a model object

Sokolova A.V., Nasakina A.E., Chernikova E.A.

FGBOU IN VolgGMU of the Ministry of Health of the Russian Federation - Federal State Budgetary educational Institution of Higher Education "Volgogradsky State Medical University" Ministry of Health of the Russian Federation, the direction of training "Biology", Russia, Volgograd, e-mail: sokolooovaaaa@yandex.ru

Annotation

The Fischer vibrio is considered as a model object for experiments in the field of genetics and medicine; basic information about the Fischer bacterium, genome features are considered; symbiotic relations with the Hawaiian squid; the structure and functioning of the lux operon are considered. The main nutrient media used for breeding the described bacterium have been determined. The main qualities of the vibrio Fischer are highlighted, thanks to which the bacterium remains in demand as a model organism.

Keywords: Fischer's vibrio, bioluminescence, lux operon, Hawaiian squid, symbiosis, sense of quorum.

Введение:

В наше время ни один эксперимент не может обойтись без модельных объектов. Модельные объекты- живые организмы, которые специально выращивают для опытов. Использование животных для таких целей основано на схожих с человеческими путях метаболизма, строения, хранения наследственной информации.

Организмы выбираются под цели и задачи исследования. Поэтому существует огромное количество модельных объектов.

Бактерии наиболее просты в использовании в опытах. Из плюсов можно отметить: простота содержания и разведения, расшифрованные геномы, возможность изменения геномов, дешевизна.

Вид *V. fischeri* относят к роду *Aliivibrio*, семейству энтеробактерии, порядку *Vibrionales*, классу гамма-протеобактерии, типу протеобактерий, царству *Bacteria*. Палочковидная

грамотрицательная бактерия *Vibrio fischeri* может обитать в виде свободноживущего планктонного организма и симбионта головоногих моллюсков и рыб. Свободноживущие планктонные бактерии могут быть обнаружены в очень низких количествах во всех океанах планеты, но больше всего в умеренных и субтропических климатических зонах. Существуют они за счет разложения органических веществ (то есть являются сапрофитами).

Основная часть.

Бактерия названа в честь Бернхарда Фишера, немецкого микробиолога.

Геном *V. fischeri* был полностью секвенирован в 2004 г. и состоит из двух хромосом, одной меньшей и одной большей.

Бактерия является ключевым исследовательским организмом для изучения микробной биолюминесценции, чувства кворума и бактериально-животного симбиоза.

Симбиотические отношения между небольшим Гавайским кальмаром, и *Vibrio fischeri* представляют собой пример особой кооперации во время роста и развития обоих организмов. *Vibrio fischeri* полезны кальмару, ведущему ночной образ жизни, стирая видимую при лунном свете тень, тем самым защищая кальмара от хищников [5]. Это происходит за счет отражающей способности световых органов кальмара. Однако для этого органы нуждаются в белках, известных как рефлектины, которые вырабатывают именно *Vibrio fischeri*. В свою очередь, кальмар обеспечивает бактерий убежищем и стабильным источником питательных веществ [1; 2].

Как уже упоминалось, геном вибриона Фишера состоит из двух хромосом, одной меньшей и одной большей. Хромосома 1 имеет 2,9 миллиона пар оснований (Mbp), а хромосома 2 - 1,3 Mbp, в результате чего общий геном составляет 4,2 Mbp.

V. fischeri имеет самое низкое содержание *G + C* из 27 видов *Vibrio*, но по-прежнему наиболее тесно связан с видами с более высокой патогенностью, такими как холера.

Наибольший интерес бактерия представляет в связи со своей способностью к биолюминесценции. Причем способны к этому лишь бактерии, живущие в симбиозе с кальмарами и рыбами, свободноживущие же *Vibrio fischeri* к этому не способны [3].

Биолюминесценция бактерий осуществляется в результате транскрипции набора из 5 генов, названного *LUX*-опероном, который контролирует биолюминесценцию за счет каталитической активности фермента люциферазы.

Транскрипция оперона *lux* индуцируется через популяционно-зависимое определение кворума. Популяция *V. fischeri* должна достичь оптимального уровня, чтобы активировать оперон люкс и стимулировать выработку света. Циркадный ритм контролирует световую экспрессию, когда свечение намного ярче днем и тусклее ночью, что требуется для маскировки [7].

По-другому люкс оперон называют люциферин - люциферазная система. Этот оперон имеет известную последовательность гена *luxCDABEG*, где *luxA* и *luxB* кодирует белковые субъединицы фермента люциферазы, а *luxCDE* кодирует комплекс редуктазы жирных кислот, который делает жирные кислоты необходимыми для механизма люциферазы. *LuxG* кодирует редуктазу флавина.

Люцифераза производит сине-зеленый свет посредством окисления восстановленного мононуклеотида флавина и длинноцепочечного альдегида двухатомным кислородом. Реакция резюмируется следующим образом:

Одной из основных систем, контролирующих биолюминесценцию посредством регуляции оперона *lux*, является определение кворума. Чувство кворума функционирует за счет производства аутоиндуктора. По мере увеличения популяции клеток уровни аутоиндукторов увеличиваются, а специфические белки, регулирующие транскрипцию генов, связываются с этими аутоиндукторами и изменяют экспрессию генов. Эта система позволяет микробным клеткам «общаться» друг с другом и координировать поведение, такое как люминесценция, для достижения эффекта которой требуется большое количество клеток.

Питательные среды

Традиционно питательные среды для этого организма включали глицерин, и многие исследователи продолжают включать этот источник углерода даже в сложные среды, которые не требуют его добавления для роста *V. fischeri*. Однако *V. fischeri* легко метаболизирует глицерин, что приводит к подкислению питательной среды, что вызывает гибель бактерий.

Выращивание *v. fischeri* из замороженных запасов

Fischeri можно выделить из замороженного сырья в растворе глицерина при -80°C и сохраняет жизнеспособность на чашках Петри около 1 недели. Бактерии можно нанести на планшеты LBS, а затем отдельные колонии можно использовать для инокуляции жидких культур.

Материалы

1. Используют стерильную палочку-апликатор, чтобы соскрести небольшое количество клеток *V. fischeri* с замороженного материала в криовале. Переносят бактерии и оставляют густую полосу на небольшом участке поверхности пластины LBS.

2. Второй стерильной палочкой-апликатором делают вторую полосу, осторожно проведя ею через тяжелую полосу один раз. Повторяют процедуру еще дважды с дополнительными стерильными палочками, чтобы получить четыре квадранта с уменьшающейся концентрацией бактерий с целью выделения отдельных колоний.

3. Переворачивают чашку и инкубируют вверх дном при температуре 28°C в течение ночи.

Другие температуры, такие как 24°C или комнатная температура, также позволят бактериям расти.

4. Хранят чашку при 4°C до 1 недели.

Рост *V. fischeri* в сложной жидкой среде

V. fischeri обычно выращивают в сложных средах, таких как LBS или SWT (среда на основе морской воды). В зависимости от анализа выбор среды может привести к значительно различным фенотипическим результатам.

1a. Из чашек с агаром: Выберите одну колонию *V. fischeri* из чашки с полосами LBS, используя стерильная палочка-аппликатор.

1b. Из замороженных культур: Соскоблите несколько клеток *V. fischeri* из замороженной культуры с палочка-аппликатор.

2. Инокулируют жидкую культуру, суспендируя клетки с палочки в 5 мл среды в стерильную стеклянную культуральную трубку. Удаляют палочку и закрывают пробирку.

V. fischeri лучше растет при хорошей аэрации. Поэтому можно использовать пробирки меньшего размера с пропорционально меньшим объемом.

3. Выращивают культуру в течение ночи при температуре 28 ° C с аэрацией путем встряхивания при 220 оборотах в минуту.

Рост *V. fischeri* в минимальной среде

Потребности в питании или ауксотрофии дикого типа и мутантных штаммов *V. fischeri* можно оценить по росту в определенной минимальной среде. Аналогичным образом, минимальная среда позволяет контролировать точный состав металлов, источников азота и источников углерода, поступающих в культуру.

Выращивание клеток происходит аналогично методу в сложной жидкой среде

1a. Из чашек с агаром: выбирают одну колонию *V. fischeri* из чашки с полосами LBS, используя стерильную палочку-аппликатор забирают небольшую часть культуры..

1b. Из замороженных культур: соскабливают несколько клеток *V. fischeri* из замороженной культуры.

2. Инокулируют жидкую культуру, суспендируя клетки с палочки в 5 мл.

3. Выращивают культуру в течение ночи при температуре 28 ° C с аэрацией путем встряхивания при 220 оборотах в минуту.

Клетки могут плохо восстанавливаться из замороженного сырья. Добавление казаминовых кислот до 0,1% может помочь клеткам восстановиться.

Хранение *V. fischeri* в замороженном виде

Для длительного хранения *V. fischeri* бактерии можно хранить в 20% глицериновом растворе при температуре – 80 °С и впоследствии извлекать

Сначала происходит высевание на жидкую питательную среду по правилам, которые я рассказывала ранее. Чтобы сохранить культуру здоровой, инкубируют только от 14 до 18 часов.

На следующий день соберут 1 мл ночной культуры и добавляют в стерильную криовальную емкость, содержащую 335 мкл 80% (в/в) глицерина. переворачивают пробирку несколько раз, чтобы обеспечить полное смешивание глицерина и культуры.

Хранят криовариант, содержащий штамм, в -80 °С.

Проверяют жизнеспособность замороженного сырья на следующий день, нанося его на чашку с агаром LBS, и инкубация полосы при 28 °С в течение ночи.

Это особенно важно, если для выращивания культуры если использовалась среда LBS, содержащая глицерин [6].

Заключение

V. fischeri послужил бактериией, на которой была впервые изучена чувствительность кворума и Lux-оперон в настоящее время принято считать модельным в исследованиях кворумных систем

Следует отметить, что не мало важным является изучение влияния токсичности ингибиторов кворума (QSI) по отношению к *Aliivibrio fischeri* и другим бактериям. В настоящее время QSI широко используются в качестве многообещающей альтернативы антибиотикам и привлекают внимание как потенциальные загрязнители.

Lux-оперон морских бактерий *Aliivibrio fischeri* в настоящее время принято считать модельным в исследованиях, а по обозначению белка LuxR, регулятора lux оперона было определено семейство LuxR-гомологичных белков – регуляторов QS систем первого типа. В настоящее время остаются открытыми ряд вопросов об эволюционном происхождении феномена биолюминесценции бактерий, а также о механизмах стабилизирующего отбора lux-оперонов у свободноживущих видов бактерий.

Также известно, что мониторинг изменений биолюминесценции обеспечивает прямую и быструю оценку эффекта возмущающего воздействия (физической силы или химического агента) на метаболизм микробов.

Кодируемые генами бактериальных lux-оперонов люциферазы в настоящее время широко используются в работах по молекулярной генетике (гены - репортеры), при биохимических анализах, в генно-инженерных работах (селекция) и ряде других. Большое

распространение приобрели работы по экологическому мониторингу, тестированию токсикантов в пищевых продуктах, а также разработке и тестированию новых медицинских препаратов с помощью цельноклеточных биосенсоров, которые основаны на транскрипционных слияниях генов бактериальных люцифераз с индуцируемыми стрессовыми промоторами [4].

Список литературы:

1. Светящиеся бактерии научили кальмара соблюдать режим дня. Их взаимоотношения оказались похожи на сожительство млекопитающих с кишечными микробами - Наука - ТАСС. – URL: <https://nauka.tass.ru/nauka/6816177> (дата обращения: 10.01.2023). – Текст : электронный.
2. Странная парочка: основа симбиоза гавайского кальмара и светящихся бактерий / Хабр. – URL: <https://habr.com/ru/company/ua-hosting/blog/546468/> (дата обращения: 10.01.2023). – Текст : электронный.
3. Glowee хочет использовать бактерии как источник света. – URL: <https://hightech.fm/2016/03/25/glowee> (дата обращения: 10.01.2023). – Текст : электронный.
4. ISO 11348-1:2007(ru), Качество воды. Определение ингибиторного воздействия проб воды на испускание света бактериями *Vibrio fischeri* (тест на люминесцентные бактерии). Часть 1. Метод с применением свежеприготовленных бактерий. – URL: <https://dgn.isolutions.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:11348:-1:ed-2:v1:ru> (дата обращения: 11.01.2023). – Текст : электронный.
5. The recruitment of the symbiont *Vibrio fischeri* from the... | Download Scientific Diagram. – URL: https://www.researchgate.net/figure/The-recruitment-of-the-symbiont-Vibrio-fischeri-from-the-environment-Upper-left-the_fig3_260120948 (дата обращения: 11.01.2023). – Текст : электронный.
6. *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage, and Common Phenotypic Assays - Christensen - 2020 - Current Protocols in Microbiology - Wiley Online Library. – URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpmc.103> (дата обращения: 11.01.2023). – Текст : электронный.
7. Манухов И. В. Бактериальные lux-опероны: Механизмы регуляции экспрессии и конструирование биосенсоров : кандидат биологических наук / И. В. Манухов. – Москва, 2000. – URL: <https://dissercat.com/content/bakterialnye-lux-operony-mekhanizmy-regulyatsii-ekspressii-i-konstruirovanie-biosensorov> (дата обращения: 10.01.2023). – Текст : электронный.