

СТАТЬЯ

УДК 579.26:579.222:593.96

**ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ВИБРИОНОВ СИМБИОНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ТРЕПАНГА *APOSTICHOPUS JAPONICUS***

**<sup>1</sup>Богатыренко Е.А., <sup>1,2</sup>Дункай Т.И., <sup>1</sup>Ким А.В., <sup>1</sup>Юнусова И.О., <sup>1,3,4</sup>Еськова А.И.**

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток;

<sup>2</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток;

<sup>3</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток;

<sup>4</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru

Поиск эффективных технологий искусственного выращивания гидробионтов, предполагающих минимальное использование антибиотиков, является актуальной задачей современной аквакультуры. Одним из наиболее перспективных способов решения этой проблемы является применение пищевых добавок на основе микроорганизмов-пробиотиков, которые способны избирательно ингибировать рост патогенных микроорганизмов, не нанося при этом вред организму хозяина. В ходе проведенных нами исследований изучена способность 134 штаммов бактерий, выделенных из пищеварительной системы дикого дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*, ингибировать рост таких микроорганизмов, как *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*. Штаммы указанных вибрионов ранее выделены из аквакультурных хозяйств, где были зарегистрированы вспышки смертности дальневосточного трепанга. Показано, что изучаемые штаммы вибрионов обладают мультирезистентностью и устойчивы к 7 и более антимикробным препаратам. По результатам проведенных работ установлено, что различную степень антимикробной активности в отношении исследуемых тест-культур проявляют 11 штаммов симбионтных бактерий трепанга (8%), из них 6 (55%) – это бактерии рода *Bacillus*. Наибольшую антимикробную активность продемонстрировали штаммы *Bacillus* sp. K32 и *Arthrobacter* sp. A16. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале симбионтной микрофлоры *Apostichopus japonicus* противостоять действию инфекционных агентов.

**Ключевые слова:** *Apostichopus japonicus*, симбионтная микрофлора, антимикробная активность, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio splendidus*

**INHIBITION OF VIBRIOS GROWTH BY SYMBIOTIC BACTERIA FROM THE JAPANESE SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS***

**<sup>1</sup>Bogatyrenko E.A., <sup>1,2</sup>Dunkay T.I., <sup>1</sup>Kim A.V., <sup>1</sup>Yunusova I.O., <sup>1,3,4</sup>Eskova A.I.**

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok;

<sup>2</sup>A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok;

<sup>3</sup>G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok;

<sup>4</sup>V.I. Ilichev Pacific Oceanological Institute, Vladivostok, e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru

The search for effective technologies on the artificial cultivation of aquatic organisms, involving minimal use of antibiotics, is an urgent task of modern aquaculture. One of the most promising ways to solve this problem is the use of food additives based on probiotic microorganisms, which are able to selectively inhibit the growth of pathogenic microorganisms without harming the host organism. In the course of our investigation, we studied the ability of 134 bacterial strains isolated from the digestive system of wild Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* to inhibit the growth of microorganisms such as *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*. The strains of these vibrios were previously isolated from aquaculture farms, where outbreaks of mortality of Japanese sea cucumber were recorded. It was shown that the studied vibrio strains are multi-drug resistant to 7 or more antimicrobial agents. According to the results of the work, it was found that 11 strains of symbiotic sea cucumber's bacteria (8%) exhibit a different degree of antimicrobial activity regarding to studied the test cultures and 6 (55%) of them are bacteria of the genus *Bacillus*. The highest antimicrobial activity was demonstrated by strains of *Bacillus* sp. K32 and *Arthrobacter* sp. A16. The obtained results indicate the high potential of the symbiotic microflora of *Apostichopus japonicus* to withstand the action of infectious agents.

**Keywords:** *Apostichopus japonicus*, symbiotic microflora, antimicrobial activity, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio splendidus*

Дальневосточный трепанг *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) – морское донное беспозвоночное животное типа иглокожих, обладающее высокой пищевой и лекарственной ценностью. Дальневосточный трепанг содержит богатый набор биологически активных химических соединений, которые действуют раздельно или в комплексе, обуславливая высокую фармакологическую

ценность получаемых из него продуктов. Известно, что различные препараты, полученные из трепанга, применяются для лечения грибковых заболеваний, воспалений скелетной мускулатуры и опорно-двигательного аппарата, а также обладают противоопухолевым и антисклеротическим действием.

В настоящее время добыча гидробионта составляет 20–25% общего мирового про-

мысла иглокожих, достигая в отдельные годы 13 тысяч тонн. Несмотря на высокую плодовитость животного, запасы дальневосточного трепанга повсеместно сокращаются, и для их восстановления необходимо осуществление комплекса специальных мероприятий. К ним относятся соблюдение режима промысла (квоты вылова, установленных сроков промысла, минимального промыслового размера животных), улучшение естественного воспроизводства трепанга, организация искусственного культивирования.

Искусственное разведение является одним из наиболее действенных методов для пополнения запасов промысловых организмов, хотя и сопряжено с серьезными техническими трудностями и требует значительных капитальных затрат. По данным литературы известно, что основной проблемой культивирования дальневосточного трепанга в условиях его искусственного воспроизводства является снижение иммунитета гидробионта и его подверженность различным инфекционным заболеваниям. Особенно наблюдается высокая смертность трепанга на ранних стадиях его развития. Наиболее частыми причинами массовой гибели являются заболевания, вызванные такими микроорганизмами, как *Vibrio splendidus* [1; 2] и *Vibrio alginolyticus* [3]. Есть упоминания об инфекциях дальневосточного трепанга, возбудителями которых являются *Vibrio parahaemolyticus* [4], *Pseudoalteromonas sp.* и *Pseudoalteromonas tetraodonis* [5].

Для ликвидации вспышек инфекционных заболеваний нередко используют различные антибиотики, что имеет ряд серьезных негативных последствий. Во-первых, морепродукты, содержащие в себе химические препараты, представляют собой угрозу для здоровья человека. Во-вторых, систематическое применение в аквакультуре антибиотиков в дальнейшем приводит к появлению возбудителей инфекционных заболеваний, устойчивых к их действию.

В связи с этим поиск альтернативных технологий выращивания гидробионтов, предполагающих минимальное использование антибиотиков, является актуальной задачей современной аквакультуры. В настоящее время наиболее перспективным способом решения этих проблем является применение пищевых добавок на основе микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры хозяина, так называемых пробиотиков. Пробиотики способны активно действовать на бактериальные патогены, корректировать механизмы иммунной защиты макроорганизма и смягчить влияние неблагоприятных факторов

среды, не нанося при этом вред организму хозяина [6].

На сегодняшний день в литературе имеется немало информации о положительном влиянии отдельных видов бактерий [1], дрожжей [2] и бактериофагов [3; 4], полученных из различных источников, на воспроизводство *Apostichopus japonicus*. В то же время в литературе представлены ограниченные сведения о составе, биохимических свойствах [7; 8] и роли симбионтной микрофлоры дальневосточного трепанга в защите от болезнетворных микроорганизмов [5]. Хотя известно, что для любых животных характерна своя нормальная микрофлора, выполняющая множество функций, в том числе защиту от патогенных микроорганизмов.

В связи с этим целью данной работы – изучить способность бактерий, выделенных из пищеварительного тракта диких особей *Apostichopus japonicus*, ингибировать рост патогенных вибрионов.

#### Материалы и методы исследования

Для работы была использована ранее полученная нами коллекция 134 штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из пищеварительной системы дальневосточного трепанга из естественной среды обитания [7]. Изучение антагонистических свойств симбионтной микрофлоры трепанга проводили на штаммах *Vibrio alginolyticus* H1822, *Vibrio parahaemolyticus* H1845 и *Vibrio splendidus* H1802, выделенных из аквакультурных хозяйств.

*Определение антибиотикочувствительности.* Перед началом работ по изучению антимикробной активности бактерий из пищеварительного тракта дальневосточного трепанга была проведена оценка антибиотикочувствительности патогенных тест-культур. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона (Difco) согласно методическим указаниям Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России [9] и рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов [10]. Подбор антимикробных соединений вели с учетом современной медицинской и ветеринарной практики. В работе были использованы диски (НИЦФ, Россия): с пенициллинами (ампициллин, амоксициллин + клавулановая кислота), цефалоспорины (цефазолин, цефотаксим, цефепим), аминогликозидами (гентамицин, канамицин, стрептомицин), хинолонами (ципрофлоксацин, налидиксовая кислота), нитрофуранами (нитрофурантоин), левомицетином и тетрациклином.

Выявление антимикробной активности коллекции симбионтных бактерий из дальневосточного трепанга. Межмикробные взаимодействия изучали методом перпендикулярных штрихов на универсальной агаризованной среде для морских микроорганизмов СММ [11], подходящей для инкубации всех исследуемых микроорганизмов. Вначале по диаметру чашки Петри со средой штрихом высевали штамм бактерии – потенциального продуцента антимикробных веществ. Инкубацию проводили при температуре 22 °С в течение 5 суток. После этого к посеву перпендикулярным штрихом подсевали тест-культуру патогенной бактерии и инкубировали еще в течение 2 суток. О наличии антимикробной активности судили по величине зоны подавления роста тест-культур вблизи посева бактерий-симбионтов, которую выражали в мм. Все опыты повторяли трижды.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Изучение антибиотикочувствительности тест-культур. Вибрионы – обычные обитатели морских и пресноводных экосистем. Некоторые из них могут быть патогенными как для людей, так и для водных животных за счет широкого спектра продуцируемых ими факторов патогенности. В последнее время растет число сообщений о случаях заражения объектов аквакультуры представителями рода *Vibrio*, что, несомненно, наносит огромный урон товарному выращиванию гидробионтов.

Вид *V. splendidus* широко распространен в морских экосистемах и долгое время считался не патогенным. Однако в последние годы в аквакультуре зарегистрировано немало случаев вспышек заболеваний, вызванных этим видом, у таких моллюсков, как *Pecten maximus*, *Crassostrea gigas*, *Octopus vulgaris*, и у рыбы тюрбо *Scophthalmus maximus* [12]. В Китае инфекции, вызванные *V. splendidus*, являются основной причиной смертности *Apostichopus japonicus* [1; 2]. К сожалению, пока не существуют достоверных диагностических инструментов для выявления и оценки потенциальной патогенной способности *V. splendidus*. Исследования рибосом и полиморфизмы гена *guyB* или RAPD не привели к выявлению маркеров, связанных с патогенностью. Таким образом, до сих пор нет фенотипических или генотипических особенностей, позволяющих отличать патогенные штаммы от непатогенных. И единственным способом определить вирулентность каждого конкретного штамма остается экспериментальное заражение.

Бактерии *V. alginolyticus* могут вызывать заболевания человека, но в основном они патогенны для объектов аквакультуры, вызывая массовую гибель как *Apostichopus japonicus* [3], так и многих видов рыб, моллюсков и ракообразных [13]. Среди их факторов вирулентности можно найти липазы, протеазы, сидерофоры и даже термостабильный прямой гемолизин (ТПГ).

Бактерии вида *V. parahaemolyticus* в основном считаются патогенными для человека и способны вызывать гастроэнтерит, раневые инфекции и сепсис. Однако есть данные о том, что эти микроорганизмы являются возбудителями острого гепатопанкреатического заболевания (AHPND) у таких видов креветок, как *Penaeus vannamei* и *Penaeus monodon* [13]. Также в литературе стали появляться сведения о гибели молоди дальневосточного трепанга, вызванной *V. parahaemolyticus* [4].

В ходе проведенных нами исследований была изучена антибиотикочувствительность трех штаммов: *V. alginolyticus* H1822, *V. parahaemolyticus* H1845 и *V. splendidus* H1802, выделенных из аквакультурных хозяйств, где была зарегистрирована высокая смертность дальневосточного трепанга (табл. 1). Установлено, что *V. alginolyticus* H1822 и *V. splendidus* H1802 проявили одинаковую чувствительность к выбранным антимикробным веществам. Так, у этих штаммов отмечалась резистентность к 7 антибиотикам разных классов: ампициллину, цефазолину, цефотаксиму, канамицину, стрептомицину, налидиксовой кислоте, тетрациклину. При этом указанные микроорганизмы были чувствительны к другим бета-лактамам (амоксциллин с клавулановой кислотой, цефепим), аминогликозидам (гентамицин), фторированным хинолонам (ципрофлоксацин), левомицетину и нитрофурантоину. Спектр антибиотикочувствительности *V. parahaemolyticus* H1845 был немного шире, чем у двух других штаммов вибрионов, что проявлялось в чувствительности также к цефотаксиму и канамицину (табл. 1).

Изучение антимикробной активности коллекции симбионтных бактерий из дальневосточного трепанга. Из 134 штаммов бактерий, выделенных из пищеварительного тракта дикого дальневосточного трепанга, различную степень антимикробной активности в отношении изучаемых тест-культур проявили 11 штаммов (8%), из них 6 (55%) – это бактерии рода *Bacillus* (табл. 2). Необходимо отметить, что представители рода *Bacillus* составляли 27% нашей коллекции [7].

Таблица 1

Антибиотикочувствительность патогенных тест-культур

Антибиотик	<i>V. alginolyticus</i> H1822	<i>V. parahaemolyticus</i> H1845	<i>V. splendidus</i> H1802
Ампициллин	Р	Р	Р
Амоксициллин + клавуланат	Ч	Ч	Ч
Цефазолин	Р	Р	Р
Цефотаксим	Р	Ч	Р
Цефепим	Ч	Ч	Ч
Гентамицин	Ч	Ч	Ч
Канамицин	Р	Ч	Р
Стрептомицин	Р	Р	Р
Ципрофлоксацин	Ч	Ч	Ч
Налидиксовая кислота	Р	Р	Р
Левомецетин	Ч	Ч	Ч
Тетрациклин	Р	Р	Р
Нитрофурантоин	Ч	Ч	Ч

Примечание: Ч – чувствительный к антибиотику микроорганизм, Р – резистентный к антибиоту микроорганизм.

Таблица 2

Антимикробная активность симбионтной микрофлоры дальневосточного трепанга

Штаммы-продуценты антимикробных соединений	Зона подавления роста тест-культур, мм		
	<i>V. alginolyticus</i> H1822	<i>V. parahaemolyticus</i> H1845	<i>V. splendidus</i> H1802
<i>Bacillus pumilus</i> A27	6	–	–
<i>Micrococcus</i> sp. K54	–	6	–
<i>Bacillus</i> sp. K33	8	–	–
<i>Micrococcus</i> sp. A34	–	–	5
<i>Bacillus</i> sp. K29	7	–	–
<i>Arthrobacter</i> sp. A16	14	–	–
<i>Kocuria</i> sp. A34	11	–	–
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. K59	10	–	–
<i>Bacillus megaterium</i> K13	11	–	–
<i>Bacillus</i> sp. K32	15	5	4
<i>Bacillus pumilus</i> K6	7	–	–

Способность угнетать рост штамма *V. alginolyticus* H1822 показали 9 штаммов симбионтных бактерий (7%). При этом наибольшие размеры зон подавления роста *V. alginolyticus* H1822 отмечались на чашках с *Bacillus* sp. K32 (15 мм) и *Arthrobacter* sp. A16 (14 мм). Что касается двух других патогенных вибрионов, то незначительное подавление их роста наблюдалось на чашках с *Bacillus* sp. K32, *Micrococcus* sp. K54, *Micrococcus* sp. A34 (табл. 2). Исходя из полученных данных, только штамм *Bacillus* sp. K32 был активен в отношении всех трех патогенных вибрионов.

Из полученных данных видно, что наибольшую антимикробную активность в отношении исследуемых тест-культур показа-

ли штаммы *Bacillus* sp. K32 и *Arthrobacter* sp. A16. Согласно литературным данным, представители указанных групп микроорганизмов нередко являются продуцентами антимикробных соединений.

Так, среди антибиотиков, образуемых бациллами, в настоящее время в медицинской практике используются грамицидин С, образуемый *B. brevis*, и полимиксины М и В, образуемые *B. polymyxa*. Бактерии рода *Bacillus* признаны мощным инструментом биоконтроля численности фитопатогенов благодаря способности продуцировать множество вторичных метаболитов различной химической природы: циклических липопептидов, полипептидов, белков и непептидных соединений. Кроме того, предста-

вители рода *Bacillus* нередко применяются в качестве пробиотиков при товарном выращивании *Apostichopus japonicus* в целях профилактики инфекционных заболеваний гидробионтов, а также для увеличения скорости роста животных [1].

Бактерии рода *Arthrobacter* также обладают высокой биологической активностью. Так, на основе бактерий *Arthrobacter davidanieli* создана и запатентована вакцина, снижающая риск возникновения заболеваний атлантического лосося *Salmo salar* и кижуча *Oncorhynchus kisutch* от таких инфекционных агентов, как *Renibacterium salmoninarum* и *Piscirickettsia salmonis* [14]. Согласно другим данным, бактерии рода *Arthrobacter* синтезируют антимикробные вещества, подавляющие рост *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. Harveyi*, *V. anguillarum*, *Yersinia enterocolitica* и *Y. ruckeri* [15].

### Закключение

Таким образом, полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о высоком потенциале симбионтной микрофлоры дальневосточного трепанга противостоять действию патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Несомненно, большой интерес представляет изучить химическую природу синтезируемых антимикробных веществ для понимания механизмов положительного действия. Полученные данные могут быть полезны как для изучения конкурентных отношений в морских микробных сообществах, так и для решения прикладных задач, таких как создание пробиотических препаратов с антимикробным действием.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00693.*

### Список литературы

1. Zhang Q., Ma H., Mai K., Zhang W., Liufu Z., Xu W. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea

cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunol. 2010. vol. 29. no. 2. P. 204–211.

2. Ma Y., Liu Z., Yang Z., Li M., Liu J., Song J. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunol. 2013. vol. 34. no. 1. P. 66–73.

3. Zhang J., Cao Z., Li Z., Wang L., Li H., Wu F., Jin L., Li X., Li S., Xu Y. Effect of bacteriophages on *Vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). J. World Aquac. Soc. 2015. vol. 46. P. 149–158.

4. Ren H., Li Z., Xu Y., Wang L., Li X. Protective effectiveness of feeding phage cocktails in controlling *Vibrio parahaemolyticus* infection of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Aquaculture. 2019. vol. 503. P. 322–329.

5. Zheng F., Liu H., Sun X., Qu L., Dong S., Liu J. Selection, identification and application of antagonistic bacteria associated with skin ulceration and peristome tumescence of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Aquaculture. 2012. vol. 334–337. P. 24–29.

6. Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000. vol. 64. no. 4. P. 655–671.

7. Bogatyrenko E.A., Buzoleva L.S. Characterization of the gut bacterial community of the Japanese Sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Microbiology. 2016. vol. 85. no. 1. P. 116–123.

8. Sha Y., Liu M., Wang B., Jiang K., Sun G., Wang L. Gut bacterial diversity of farmed sea cucumbers *Apostichopus japonicus* with different growth rates. Microbiology. 2016. vol. 85. no. 1. P. 109–115.

9. МУК 4.2.1890–04 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора МЗ России, 2004. 91 с.

10. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guideline, CLSI Document M45-A2 3rd Edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. 120 p.

11. Yochimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of Salmonids. Fish Pathol. 1976. vol. 10. no. 2. P. 243–259.

12. Gay M., Renault T., Pons A.-M., Le Roux F. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Diseases of Aquatic Organisms. 2004. vol. 62. P. 65–74.

13. Plaza N., Castillo D., Pérez-Reytor D., Higuera G., García K., Bastías R. Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. Electron. J. Biotechnol. 2018. vol. 31 P. 24–33.

14. Saloni K., Siderakis C., MacKinnon A.M., Griffiths S.G. Use of *Arthrobacter davidanieli* as a live vaccine against *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis* in salmonids. Developments in biologicals. 2004. vol. 121. P. 189–197.

15. Wietz M., Mansson M., Bowman J.S., Blom N., Ng Y., Gram L. Wide distribution of closely related, antibiotic-producing *Arthrobacter* strains throughout the Arctic Ocean. Applied and environmental microbiology. 2012. vol. 78. no. 6. P. 2039–2042.